Das ribosomale Protein S 8 von Escherichia coli: Primärstruktur, Mutanten, Beiträge zur Raumstruktur und zur Wechselwirkung mit der ribosomalen RNS

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde des

Fachbereichs Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Chem. HERBERT STADLER

aus München

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0071

Das ribosomale Protein S8 von Escherichia coli: Primärstruktur, Mutanten, Beiträge zur Raumstruktur und zur Wechselwirkung mit der ribosomalen RNS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Herbert Stadler
aus München

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Wittmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Manecke

Tag der mundlichen Prufung: 5. 12. 74

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	5
I.	Proteinisolierung	5
II.	Primärstrukturaufklärung	9
1.	Allgemeines Vorgehen	9
2.	Proteinspaltungen	10
3.	Peptidtrennungen	12
4.	Edmanabbau	16
5.	Exopeptidasen	26
III.	Röntgenaufnahmen von Fasern	28
1.	Darstellung der Fasern	28
2.	Aufnahmetechnik	28
IV.	Sedimentation in der Ultrazentrifuge	29
V.	Versuche zur Wechselwirkung des Proteins mit der rRNS	30
1.	Spezifische Bindung des Proteins S8 an die 16S rRNS	30
2.	Behandlung des 16S rRNS/S8 Komplexes mit Trypsin	31
C.	Resultate	32
I.	Primärstruktur des ribosomalen Proteins des Wildtyps	32
1.	Isolierung der tryptischen Peptide	32
2.	Sequenzen der tryptischen Peptide	38
3.	Bromcyan-Peptide	42
4.	N-terminaler Edmanabbau des Proteins	44
5.	Bestimmung der Reihenfolge der tryptischen Peptide im Protein	44

Seite

6. Erstellung der Gesamtsequenz 49
7. Primärstruktur 49

II. Primärstruktur der S8-Proteine aus den Mutanten 52

1. Protein S8 der Mutante N4128 55
2. Protein S8 der Mutante N4003 59

III. Voraussage der Sekundärstruktur aufgrund der Primärstruktur 61

IV. Experimentelle Ergebnisse zur Sekundärstruktur 63

1. Proteinfasern 63
2. Fasern des Bromcyanpeptides IV 64

V. Assoziationsverhalten des Proteins S8 67

VI. Versuche zur Protein-RNS Wechselwirkung 70

1. Experimente zur Komplexbildung mit der 16S rRNS 70
2. Tryptische Verdauung des 16S rRNS/S8 Komplexes 72

D. Diskussion 73

I. Primärstruktur 73

II. Mögliche Raumstruktur und Funktion des Proteins S8 im Ribosom 76

E. Zusammenfassung 80

F. Literaturverzeichnis 82

A. EINLEITUNG

Die Knüpfung der Peptidbindung in der Protein synthetisierenden Zelle ist ein komplexer Vorgang, dessen Stereochemie und Reaktionsmechanismen bislang nur in groben Modellvorstellungen beschrieben werden kann. Erst wenn die teilnehmenden Teilchen genügend genau bestimmt sind, kann dieser elementare Prozeß verstanden werden. Sein prinzipieller Verlauf dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit bei Einzellern wie bei höher entwickelten Zellen der gleiche sein.
Im Zentrum der Proteinbiosynthese wirken die Ribosomen. Ihr kompliziertes Zusammenspiel mit der Messenger-RNS, der Transfer-RNS und Enzymen steuert die Verknüpfung von aktivierten Aminosäuren in hoher Präzision, gemäß den Basentripletts der Messenger-RNS, zu Polypeptiden. Um tieferen Einblick in die Wirkungsweise des Ribosoms zu gewinnen, müssen seine Bausteine in Sequenz und Raumstruktur bekannt sein.

Die Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli bestehen aus zwei Untereinheiten, die man nach ihrem Sedimentationsverhalten als 30S und 50S Partikel bezeichnet. Die kleinere Untereinheit enthält 21 verschiedene Proteine und eine Ribonukleinsäure von 16S, die größere Untereinheit 34 Proteine und zwei Ribonukleinsäuren von 23S und 5S (s. Übersichtsartikel von Garrett und Wittmann, 1973).
Das kleinere Partikel kann in vitro in seine Einzelbestandteile zerlegt und wieder zu einer voll funktionsfähigen Ribosomenuntereinheit rekonstituiert werden (Nomura, 1970). Bei diesem Vorgang nehmen einige Proteine eine besondere Rolle ein.

Sie binden spezifisch im Verhältnis 1:1 an die ribosomale Nukleinsäure (rRNS), erkennen dabei jeweils einen ganz bestimmten Bindungsort und ermöglichen so den geordneten Aufbau des kompakten sphärischen Aggregats.
Die dabei auftretenden Protein-RNS-Wechselwirkungskräfte spielen nicht nur im Ribosom, sondern im ganzen Zellgeschehen, z.B. bei der Regulation der Proteinbiosynthese oder bei RNS-haltigen Viren, eine wichtige Rolle. Experimentelle Daten über die Art der zwischenmolekularen Kräfte und ihrer stereochemischen Basis liegen kaum vor.
Mindestens 5 der 21 Proteine der 30S Untereinheit binden spezifisch an die 16S RNS, darunter das Protein S8, das auch einzeln an die isolierte rRNS bindet. In dem entstehenden Komplex ist ein bestimmter Bereich der rRNS gegen Ribonukleaseverdauung geschützt. Nach kontrollierter Verdauung mit pankreatischer Ribonuklease entsteht ein Ribonukleoproteinfragment, dessen RNS-Teil aus etwa 40 Nukleotiden besteht (Schaup et al., 1973), deren bekannte Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Voraussage über die Sekundärstruktur ermöglichte (Ehresmann et al, 1974). Dieses Protein-RNS Partikel ist dissoziier- und rekonstituierbar (Ungewickell, 1974); es bietet sich daher als Modell für ein Studium der Protein-RNS Wechselwirkung an.

Weiterhin wurden zwei temperatursensitive Mutanten des Proteins S8 beschrieben (Zubke et al., 1974), die möglicherweise Aufschluß über die Funktion des Proteins im Ribosom geben. Die Kenntnis der Sequenzveränderung dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp kann neben dem allgemeinen genetischen Interesse weiteren Aufschluß über Protein-RNS oder Protein-Protein Inter-

aktion geben und vielleicht eine Lokalisation der Temperatursensitivität des Ribosoms gestatten. Erst die Aufklärung der Primärstruktur des Proteins S8 läßt ein weiteres Studium seiner Eigenschaften sinnvoll erscheinen; denn sie schafft (a) die Voraussetzung für die Interpretation der Elektronendichtekarten bei der begonnenen Röntgenstrukturanalyse des Proteins (Paradies, 1974), (b) die Basis für eine geplante NMR-Spektroskopie des erwähnten Ribonukleoproteinpartikels, (c) die Voraussetzung für das Auffinden der Aminosäureaustausche der Mutanten, (d) die Möglichkeit der Voraussage der Sekundärstruktur auf Grund der Primärstruktur (Chou und Fasman, 1974). Aussagen über die Sekundärstruktur in Kombination mit bereits vorliegenden hydrodynamischen Daten über Achsenverhältnis und Assoziationsverhalten (Paradies, 1973) können bereits ein ungefähres Modell eines nichtglobulären ribosomalen Proteins liefern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Primärstruktur des ribosomalen Proteins S8 und seiner beiden temperatursensitiven Mutanten zu klären sowie Beiträge zur Raumstruktur und seinem Verhalten der ribosomalen RNS gegenüber zu leisten. Zur Aufklärung der Primärstruktur sollten moderne Methoden der Sequenziertechnik, insbesondere der automatische "Edmanabbau" im Proteinsequenator (Edman und Begg, 1967) und im Festphasensequenator (Laursen, 1971) erprobt und weiter entwickelt werden. Die aufwendige Isolierung des Proteins gestattete nur geringe Ausbeuten und machte die Anwendung von empfindlichen, neuesten Methoden notwendig. So erfolgte die Identifizierung der Phenylthiohydantoide, der Endprodukte des Edmanabbaus, mit-

tels Massenspektrometrie oder nach der Isotopenverdünnungsmethode als radioaktiv markierte Derivate. Bei der Isolierung von Peptiden nach Spaltung mit Bromcyan gelang die Darstellung und röntgenographische Charakterisierung einer Peptidfaser von hohem Orientierungsgrad. Dieses Peptid behielt die Fähigkeit des Proteins, spezifisch an die 16S rRNS zu binden.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Proteinisolierung

Im folgenden wird die von mir ausgeführte Isolierung des ribosomalen Proteins S8 von E.coli am Beispiel von zwei temperatursensitiven Mutanten beschrieben(vgl.Hindennach et al.,1971). Zum Sequenzieren des Wildtyps wurden mir etwa 150 mg Protein S8 vom Institut zur Verfügung gestellt.

(a) Isolierung der 30S Untereinheit des Ribosoms

Etwa 1 kg eingefrorene Bakterienzellen werden aufgetaut und in Portionen zu etwa 100 g intensiv im Mörser 10 min mit 150 g Alcoa zerrieben. Nach Zugabe von 150 ml Puffer (0.01 m KH_2PO_4, 0.001 m $MgCl_2$, 0.01 m Mercaptoäthanol, pH 7.4) werden das Alcoa und die groben Zellpartikel durch Zentrifugieren (16000 Upm, 40 min) entfernt. Der Überstand enthält die in ihre Untereinheiten dissoziierten Ribosomen und gelangt unmittelbar zum Auftrag auf 4 Zonalrotoren. Die isopyknische Zentrifugation auf Sucrosegradienten ergibt einen Trennverlauf, wie in Abb.1 dargestellt.

(b) Extraktion der Proteine

Von den gesammelten 30S Untereinheiten wird der Zucker durch Dialyse (72 h) gegen destilliertes Wasser entfernt. Das Dialysat wird am Rotationsverdampfer auf 1 l eingeengt, mit 2/3 Volumen an Äthanol versetzt und die Ribosomenuntereinheiten bei -20° C präzipitiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in 200 ml 66 %iger Essigsäure, die 0.2 m Magnesiumacetat enthält, aufgenommen und 1 h im Eisbad intensiv gerührt. Die aus-

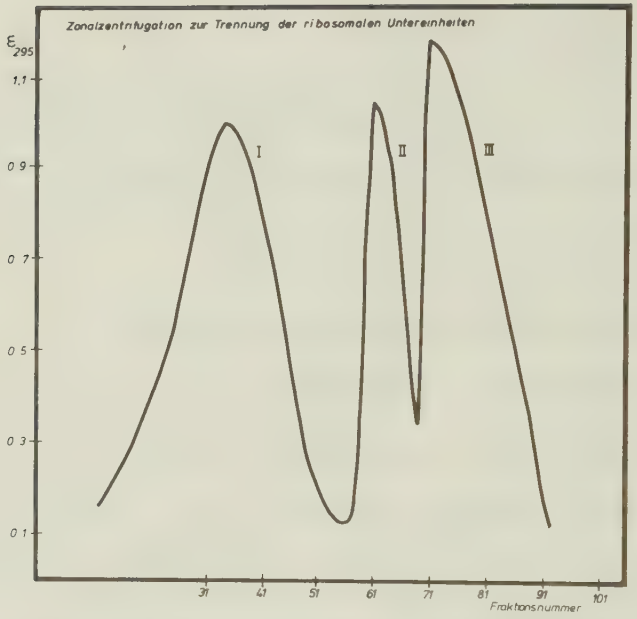

Abbildung 1:

Zentrifugation von E. coli Ribosomen im Spinco B XV Ti Rotor (25000 Upm, 17 h, 7.5 bis 38 % Sucrose, pH 7.4, 0.01 m KH_2PO_4, 0.001 m $MgCl_2$, 15 ml per Fraktion)

I: niedermolekulare Zellkomponenten
II: ribosomale 30S Untereinheiten
III: ribosomale 50S Untereinheiten

fallende Nukleinsäure wird abzentrifugiert (30 min, 16000 Upm), der Überstand, der die Proteine enthält, eingeengt und 24 h gegen 2 % Essigsäure dialysiert, daran anschließend lyophilisiert und ausgewogen. Die Ausbeute an "30S Protein" betrug etwa 2 g, d.h. etwa 0,2 % bezogen auf 1 kg Bakterien als Ausgangsmaterial.

(c) Trennung der Proteine an Ionenaustauschern

Die gewonnenen 2 g 30S Proteine werden auf eine mit Carboxymethylcellulose (whatman, Cm 32, microgranular) gepackte Säule (120 x 3 cm) aufgetragen. Der Auftragspuffer entspricht dem Startpuffer für einen sich anschließenden Pyridinformiat-Gradienten aus zwei 7.5 l Gefäßen:

1. Gefäß 0.01 m Pyridinformiat, 6 m Harnstoff, 0.001 m Mercaptoäthanol, pH 3.3

2. Gefäß 0.6 Pyridinformiat, 6 m Harnstoff, 0.001 m Mercaptoäthanol, pH 4.4

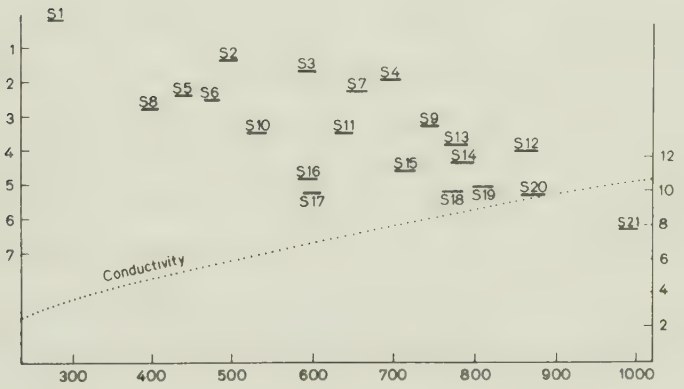

Abbildung 2:

Ordinate: Wanderung der Proteine bei der Gelelektrophorese
Abszisse: Elutionsvolumen, 14 ml Fraktionen

(d) Polyacrylamidegel-Elektrophorese

Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels Polyacrylamidegel-Elektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1969). Dazu werden von jeder 5. ca. 15 ml enthaltenden Fraktion 0.7 ml abgenommen, gegen destilliertes Wasser dialysiert und am Rotationsverdampfer einrotiert.

Die Proben werden auf 15-prozentige Polyacrylamid-Harnstoffgele aufgetragen und nach dem Wandern mit Amidoschwarz angefärbt. Das Protein S8 wird gesammelt und auf seine Reinheit auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann, 1970) getestet. Das Protein wird auf Biogel P10 mit 15 % Essigsäure entsalzt, nochmals dialysiert und schließlich lyophilisiert oder gelöst in 2 % Essigsäure aufbewahrt. Die Ausbeute an Protein S8 aus 1 kg Bakterien betrug etwa 30 bis 40 mg.

II. Primärstrukturaufklärung

1. Allgemeines Vorgehen

Die wichtigste Methode zur Ermittlung der Primärstruktur eines Proteins ist zur Zeit der chemische Abbau der Polypeptidkette nach Edman (1949), der fast sämtliche früher übliche Verfahren verdrängt hat.
Die hohen Ausbeuten bei diesem Reaktionszyklus haben zur Entwicklung von zwei automatisierten Verfahren geführt, nämlich dem Proteinsequenator nach Edman und dem Festphasensequenator nach Laursen. Sie bedeuten eine erhebliche Arbeits- und Zeitersparnis gegenüber dem manuellen Edmanabbau im Reagenzglas. Da mir beide Verfahren zur Verfügung standen, war das Vorgehen beim Sequenzieren des Proteins S8 davon bestimmt, (a) das intakte Protein möglichst weit N-terminal abzubauen und (b) den nicht sequenzierten Rest in Bruchstücken zu isolieren und deren Primärstruktur möglichst, wieder unter Anwendung des automatisierten Edmanabbaus, zu ermitteln. Die verbleibende Aufgabe besteht darin, die Aufeinanderfolge der Bruchstücke, wie sie im Protein vorliegen, aufzufinden. Man spaltet dazu das Protein in Peptide, die die bereits sequenzierten Bruchstücke überlappen, und erhält aus deren Bruttozusammensetzung im allgemeinen bereits die gesuchte Zuordnung.

Auf Grund der Aminosäurenzusammensetzung des Proteins S8 (Kaltschmidt, Dzionara und Wittmann, 1970) war es das Ziel dieser Arbeit, Peptide, die durch enzymatische Spaltung mit Trypsin entstehen, am Festphasensequenator zu sequenzieren und größere Peptide, die bei der chemischen Spaltung mit Bromcyan ent-

stehen, dem Edmanabbau im Proteinsequenator zu unterwerfen.

2. Proteinspaltungen

(a) Trypsin

15 mg lyophilisiertes Protein S8 werden in 2 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 0.05 % Ammoniak auf 7.8 eingestellt, wobei sich die Lösung trübt. Dann werden 150/ug mit TPCK* behandeltes Trypsin (Enzym:Substrat = 1:100) der unter Stickstoff und bei 37° C gehaltenen Lösung zugefügt. Nach zwei Stunden gibt man der jetzt klaren Lösung weitere 150/ug TPCK-Trypsin zu, bricht nach insgesamt 16 Stunden durch Einfrieren ab und lyophilisiert sofort.

(b) Trypsin, nach Blockieren der Lysine

Nach Riley und Perham (1970) reagiert die ε-Aminogruppe von Lysin sowie alle weiteren freien Aminogruppen eines Proteins mit exo-cis-Endoxo-Tetrahydrophtalsäureanhydrid (ETPA) zum Dicarbonsäuremonoamid. Setzt man somit Protein S8 mit diesem Reagens um, so kann Trypsin nur noch an den Argininen spalten, denn die Lysine sind blockiert. Somit können für Zuordnungsversuche nützliche Peptide gewonnen werden, deren Lysine sich leicht im sauren Milieu deblockieren lassen.
ETPA wurde, nach Diels-Alder (1929) aus Maleinsäureanhydrid (Merck) und Furan (Merck) dargestellt, aus Chloroform umkristallisiert. Zersetzungspunkt war 115-116° C, was den Literaturangaben entspricht.
Bei 2° C läßt man 1 mg Protein S8 mit 1,6 mg ETPA (12-facher

---

*TPCK = 1-Chlor-4-phenyl-3-tosylamino-2-butanon

molarer Überschuß über die freien Aminogruppen des Proteins) unter Rühren in 1 ml 0.05 m Boratpuffer, pH 8.8, reagieren. Das vorher ungelöste Protein und das Reagens gehen allmählich in Lösung. Nach einer Stunde wird die jetzt klare Lösung gegen 0.05 % $(NH_4)_2CO_3$, pH 8.0, bei 4° C für 12 h dialysiert.

(c) Trypsin, nach Modifikation von Cystein

Nach Crestfield (1963) reduziertes und gelöstes Protein (0.5 m Tris-hydroxy-aminomethan/HCl, pH 8.6, 1 % Mercaptoäthanol) wird mit der doppelten Menge an Äthylenimin (25° C, 30 min) behandelt. Vorhandene Cystein-Seitenketten werden dabei S-aminoäthyliert; das entstehende Derivat ähnelt räumlich der Lysinseitenkette und wird von Trypsin (Bedingungen wie unter (a)) gespalten (Cole, 1967).

(d) Chymotrypsin

In destilliertem Wasser gelöstes Protein wird bei 37° C mit 0.05 % Ammoniak bis pH 8.6 versetzt. Die trübe Lösung wird nach Zusatz von Chymotrypsin (Enzym:Substrat = 1:200) rasch klar. Nach einer Stunde wird die Lösung lyophilisiert.

(e) Thermolysin

Spaltung erfolgt bei pH 8.0 in 0.002 m $CaCl_2$-Lösung. Die übrigen Bedingungen sind dieselben wie bei der chymotryptischen Hydrolyse.

(f) Staphylococcus-Protease

Die von Hommard und Drapeau (1972) beschriebene Protease soll die Proteinkette spezifisch nach Glutaminsäureresten spalten. In 0.05 m NH_4HCO_3 Puffer (pH 7.8) gelöstes Protein wird bei

37° C mit Enzym versetzt (Enzym:Substrat = 1:30); nach 48 Stunden wird lyophilisiert. Die Protease wurde von Drapeau zur Verfügung gestellt.

(g) Chemische Spaltung mit Bromcyan (Witkop, 1961)

10 mg Protein werden in 1 ml 70 % Ameisensäure gelöst (0.01 m Mercaptoäthanol) und bei Raumtemperatur 18 Stunden mit BrCN (100fach molarer Überschuß über enthaltene Methionine) versetzt. Anschließend wird mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

3. Peptidtrennungen

(a) Ionenaustauschchromatographie

25 g Sulfoäthylcellulose (SE-Cellulose, Serva, Heidelberg) läßt man in 0.5 m NaOH unter ständigem Rühren eine halbe Stunde lang quellen. Dann wäscht man auf einem Büchnertrichter mit 0.5 m NaCl-Lösung, bis der pH-Wert des Eluats etwa 9 ist. Darauf folgt Waschen mit 0.5 m HCl und anschließend mit 0.5 m NaCl-Lösung bis pH 4. Der Austauscher wird unter wasserstrahlvakuum eine Stunde lang entgast, die Säule (45 x 1,5 cm, 25° C, Durchflußrate 60 ml/h) unter einem Druck bis 0.3 kg/cm^2 gepackt und mit 0.01 m Pyridin-Formiat Puffer (pH 2.6) äquilibriert. In 2 ml desselben Puffers löst man die von 15 mg Protein erhaltenen lyophilisierten Peptide und trägt sie auf die Säule auf. Nach den ersten Fraktionen mit je 4 ml Äquilibrierpuffer wird der pH-Wert und die Konzentration des Puffers kontinuierlich nicht-linear mit einem angeschlossenen Mischgerät verändert (siehe Abschnitt Resultate).

(b) Papierchromatographie

Von jeder 4. Fraktion der bei der Trennung an SE Cellulose anfallenden Fraktionen werden 2 ml abgenommen und lyophilisiert. Der Rückstand wird in 0.1 ml 50 %iger Essigsäure gelöst und auf Chromatographiepapier (Schleicher-Schüll 2043b Mgl) aufgetragen. Das Chromatogramm wird nach der absteigenden Methode in Pyridin, n-Butanol, Eisessig, Wasser (10:15: 3:12, Volumenprozente) entwickelt. Beim Besprühen mit Ninhydrin-Reagens (0.3 % Ninhydrin, 3 % Collidin, 10 % Eisessig, 86,7 % Äthanol) sowie einem Chlortest nach Mazur (1962) ergeben die entsprechenden Farbflecken ein Testchromatogramm, das schematisch in Abbildung 9 (Kapitel Resultate) eingezeichnet ist. Entsprechend diesem Test werden die Fraktionen zur Isolierung reiner Peptide in präparativem Maßstab chromatographiert, mit 50 % Eisessig vom Papier eluiert und zur weiteren Verwendung lyophilisiert.

(c) Fingerprinttechnik

Als Fingerprint oder Peptidkarte bezeichnet man ein Diagramm, das entsteht, wenn Peptide in einem Punkt auf Papier aufgetragen werden, dann in einer Richtung elektrophoretisch und anschließend in der dazu senkrechten Richtung papierchromatographisch getrennt werden. Ihre Lage wird mit den üblichen Testmethoden sichtbar gemacht.

2 mg lyophilisierte tryptische Peptide werden in 20 µl 30 %iger Ameisensäure gelöst, in einem möglichst kleinen Punkt auf mit nachstehendem Puffer angefeuchtetem Whatman 3 MM Papier aufgetragen und zur Trennung in der ersten Dimension einer Hochspannungselektrophorese unterworfen (3000 V; 2.5 h; Puffer

pH 4.4; Pyridin, Eisessig, Wasser, Aceton im Volumenverhältnis 2:4:79:15). In der zweiten Dimension wird papierchromatographisch mit dem bereits erwähnten Laufmittel entwickelt. Nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagens werden die entstandenen Flecken ausgeschnitten, die Peptide mit 50 %iger Essigsäure eluiert und zur anschließenden Aminosäureanalyse am Rotationsverdampfer getrocknet. Das Ninhydrin bewirkt eine teilweise Zerstörung der α- und ε-Aminogruppen der Peptide; diese sind daher für den an der α-Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure einsetzenden Edmanabbau nicht mehr zu gebrauchen. Um den Ninhydrintest zu umgehen, wurden die Peptide vorher, wie im folgenden Punkt (e) beschrieben, radioaktiv markiert. Die Lage der Peptide wurde durch Auflegen eines Filmes (Agfa Curix RP1) ermittelt. Diese Methode gestattete die rasche und einfache Isolierung von kleinen Peptiden in relativ hohen Ausbeuten. Beim Auftrag von 3 mg tryptischen Peptiden (etwa 250 Nanomol) konnten einzelne Peptide in Mengen bis zu 150 Nanomol eluiert werden.

(d) Gelfiltration

Die Trennung tryptischer Peptide erfolgt an Sephadex G15 (Pharmacia Fine Chemicals) in 20 % Essigsäure (Säule 200 x 1 cm, 25° C, Durchfluß 8 ml/h, 1 ml Fraktionen). Zur Trennung der BrCN-Peptide wird Sephadex G25 verwendet (Säule 250 c 1 cm, 25° C, Durchfluß 8 ml/h, 1 ml Fraktionen). Zur Vermeidung von Peptidaggregationen wird jedoch 36 % statt 20 % Essigsäure in 6-molarem Harnstoff benutzt. Das Vorbereiten der Gele und Füllen der Säulen geschieht unter den in der Broschüre "Sephadex-Gelfiltration" (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt) geschilder-

ten Bedingungen. Die BrCN-Peptide werden auf Sephadex G10 (100 x 2 cm, 0.2 % NH_4HCO_3) entsalzt und lyophilisiert.

(e) Radioaktive Markierung der Peptide

Um Peptide nach chromatographischen Trennprozessen auch in kleinen Mengen nachweisen zu können, werden ihre primären Aminogruppen mit ^{14}C-Formaldehyd unter reduzierenden Bedingungen methyliert (Rice und Means , 1971). Diese Methode erspart den Ninhydrin-Test und erlaubt den Nachweis von Peptiden in Puffern ohne Absorptionsmessung.
Etwa 100 Nanomol Peptide werden bei pH 9.0 (0.1 m Borat/HCl) in 1 ml Puffer bei 0° C gelöst, mit 100 Nanomol ^{14}C-Formaldehyd (Amersham/Buchler) in 50 µl H_2O versetzt. Unter starkem Rühren werden kurz nacheinander 3 x 100 µl $NaBH_4$-Lösung (10 mg/ml H_2O) zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf Sephadex G15 (0.2 % NH_4HCO_3) von Salz und überschüssigem Formaldehyd befreit. Der Methylierungsgrad lag (je nach Löslichkeit der Peptide im Reaktionspuffer) zwischen 1 und 5 %. Neben den α-Aminogruppen der Peptide reagierten bevorzugt die ε-Aminogruppen der Lysine. Der äquimolare Ansatz von Peptid und Formaldehyd reduzierte die bei Formaldehydüberschuß in hohen Ausbeuten ablaufenden Nebenreaktionen, so daß die α-Aminogruppen unblokkiert für den Edmanabbau zur Verfügung standen.

(f) Aminosäureanalyse

Die Peptide werden mit 5.7 n doppelt destillierter HCl versetzt, die zum Schutz leicht oxydierbarer Aminosäuren 0.02 % Mercaptoäthanol enthält. Die Lösungen werden in Hydrolyseglaschen gefüllt, entlüftet, mit Stickstoff gespült und unter Stickstoff

abgeschmolzen. Nach 20 Stunden bei 110° C werden die eingedampften Proben auf einen Aminosäureanalysator der Firma Beckman (München) gegeben, der mit automatischem Probenaufgeber und Mikroküvetten ausgerüstet ist. Die zur Analyse gegebenen Mengen lagen zwischen 1 und 10 Nanomol. Die in den Tabellen im Abschnitt Resultate aufgeführten Werte für die einzelnen Aminosäuren sind nicht für unvollständige Hydrolyse oder teilweise Zerstörung korrigiert. Tryptophan wurde nach der Methode von Liu und Chang (1971) bestimmt. Statt in 5.7 n HCl wird das Protein in 3 n p-Toluolsulfonsäure hydrolysiert, die 0.2 % 3-(-2-Aminoäthyl)-Indol enthält. Tryptophan bleibt unzerstört und wird auf dem Aminosäureanalysator nachgewiesen.

4. Edmanabbau

Die in Abb.3 gezeigten Reaktionsfolgen des Edmanabbaus beginnen mit der Anlagerung von Phenylisothiocyanat im alkalischen Milieu an die primäre N-terminale Aminogruppe des Polypeptids. Nach Entfernung der überschüssigen Reagenzien bewirkt Säure am gebildeten Phenylthiocarbamylpeptid eine Zyklisierung und Abspaltung der ersten Aminosäure als Thiazolinonderivat. Nach der Trennung vom Peptid wird das Thiazolinon im wäßrigen, sauren Milieu in das stabilere Phenylthiohydantoin umgelagert; das Restpeptid wird einem erneuten Zyklus unterworfen. Die Identifizierung der Hydantoine wird in Abschnitt (c) erläutert. Grundsätzlich wäre es möglich, beliebig viele Abbaustufen durchzuführen und so ein ganzes Protein zu sequenzieren. Prak-

tisch wird dagegen wegen nicht ganz quantitativ ablaufender Reaktionen sowie Nebenreaktionen und mechanischer Verluste nach einer gewissen Zahl von Zyklen die eindeutige Auswertung der Phenylthiohydantoine unmöglich.

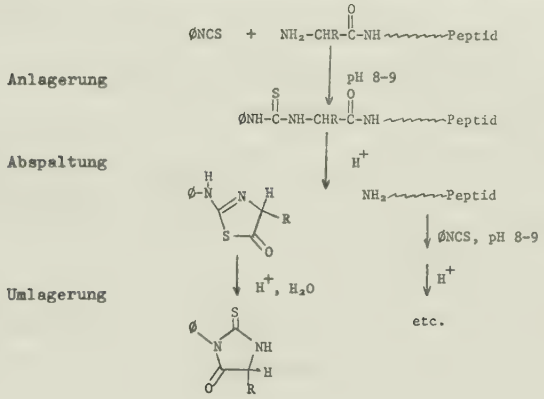

Abbildung 3:

Reaktionsschema des Abbaus nach Edman

(a) Proteinsequenator

Im Proteinsequenator nach Edman und Begg bildet das Protein oder Peptid an der Innenwand eines rotierenden Glaszylinders einen dünnen Film, dessen große Oberfläche und Stabilisierung

durch die Zentrifugalkraft optimale Reaktions- und Extraktionsbedingungen bietet. Lösungsmittel und Reagenzein strömen vom Zylinderboden über den Proteinfilm nach oben und werden dort aufgefangen.

Verwendet wurde ein nach Wittmann-Liebold (1973) modifizierter Proteinsequenator der Firma Beckman (Palo Alto, USA), bei dem die aus dem rotierenden Glaszylinder extrahierten Thiazolinone automatisch sofort weiter zu den Thiohydantoinen umgelagert werden.

Die Bedingungen der einzelnen Reaktionsschritte:

1) Anlagerung
   Phenylisothiocyanat, Quadrol (N,N,N',N', - Tetrakis-(2-Hydroxypropyl)-Äthylendiamin) und Trifluoressigsäure, pH 9.0; Reaktionszeit: 15 min; T = 55° C.

2) Extraktion des überschüssigen Phenylisothiocyanats mit Benzol, des Quadrols mit Essigsäureäthylester.

3) Abspaltung der Thiazolinone
   Heptafluorbuttersäure, Extraktion der Thiazolinone mit Chlorbutan; T = 55° C.

4) Umlagerung
   20 % Trifluoressigsäure; 70° C; 15 min

Reaktionszyklus beginnt von neuem.

Reagenzein: Benzol (Merck, Uvasol)
Essigsäureäthylester (Merck, Uvasol)
Alle anderen Reagenzien von der Firma Beckman, "Sequencer grade".

Um Elutionsverluste bei kleineren lysinhaltigen Peptiden zurückzudrängen, werden Peptide nach der Methode von Braunitzer et al. (1971) mit hydrophilen Senfölen umgesetzt.
200 Nanomol des tryptischen Peptides T 16 (siehe Abb.13) werden in 40 µl Wasser gelöst, mit 40 µl Dimethylaminopropin versetzt und bei 40° C 2 h mit 1 Mikromol 7-(Isothiocyanato)-naphtalin-1, 3,5-trisulfonsäure (Trinatriumsalz) umgesetzt. Zum Abtrennen von überschüssigem Reagens und zur Reinigung des Peptids wird das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G15 Säule (40 x 1 cm, 0.2 % NH_4HCO_3) getrennt. Die Peptidfraktionen werden lyophilisiert und sofort in das Reaktionsgefäß des Proteinsequenators eingetragen. Das Senföl wurde von Braunitzer zur Verfügung gestellt.

(b) Peptidsequenator (Festphasensequenator)

Angeregt durch die erfolgreiche Synthese von Peptiden an fester Phase nach Merrifield (1963), wurde von Laursen (1971) der Edmanabbau an Peptiden durchgeführt, die chemisch an Harze gebunden sind. Überschüssige Reagenzein und Thiazolinone werden ausgewaschen, Extraktionsverluste entstehen nicht.
Der Abbau wurde an einem unter Anleitung von Laursen im Institut angefertigten Gerät durchgeführt. Die Methode wurde hauptsächlich für kleine Peptide (3-15 Aminosäuren) angewendet, besonders für tryptische Peptide, deren C-terminaler Lysin- oder Argininrest sich am einfachsten an Harze binden läßt.
Die Reaktionsbedingungen bei den einzelnen Stufen des Edmanabbaus sind im wesentlichen dieselben wie beim Proteinsequenator. Als Trägerharz diente ein nach Laursen (1971) dargestelltes Aminopolystyrolharz sowie ein Triäthylentetraminharz (1974),

das von Laursen zur Verfügung gestellt wurde.

α) Bindung von Peptiden mit C-terminalem Lysin (Laursen, 1971):

50 - 100 Nanomol Peptid wird in 0.05 ml N-Methylmorpholin/Trifluoressigsäure-Puffer, pH 9.5, gelöst und mit 5 µMol p-Phenyldiisothiocyanat in 0.1 ml Dimethylformamid (DMF) versetzt. Die Lösung wird für 30 min auf 45° C erwärmt und dann zu 35 mg in DMF gequollenem Aminopolystyrolharz gegeben. Die überschüssigen Aminogruppen des Harzes werden bei Raumtemperatur eine Stunde mit 0.1 ml Methylisothiocyanat (in 0.1 ml N-Methylmorpholin/DMF, 1:1) behandelt. Das jetzt an das Harz gebundene Peptid wird mit Methanol gewaschen, dann getrocknet, mit Glaspulver vermischt und in ein oben und unten mit Fritten abgedichtetes Glasrohr gebracht, durch das Reagenzien und Lösungsmittel des Edmanabbaus strömen können (siehe Abb.5).

β) Bindung von Peptiden mit C-terminalem Arginin (s. unter α):

Peptide werden mit 0.5 ml 20 % Hydrazinlösung versetzt und 30 min auf 105° C erhitzt. Die Argininseitenkette wandelt sich dabei zum Ornithin um (s.Abb.4). Das Peptid wird getrocknet und nach der oben geschilderten Methode für Lysinpeptide an Harz gebunden.

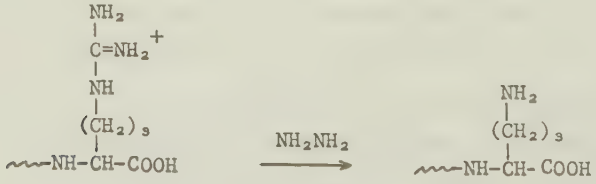

Abbildung 4

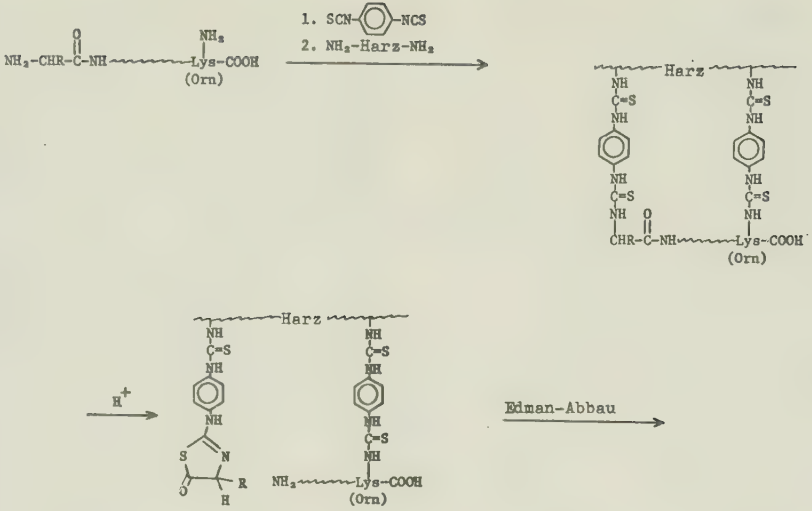

Abbildung 5:

Bindung von Peptiden mit C-terminalem Lysin und Arginin

γ) Bindung der C-terminalen Carboxylgruppe mit Carbodiimid (s. unter α):

100 Nanomol Peptid wird in 0.5 ml Dimethylformamid (DMF) und 0.05 ml N-Methylmorpholin mit 0.075 ml t-Butyloxycarbonylazid versetzt und bis zum Entstehen einer klaren Lösung gerührt. Man erwärmt dann 5 h auf 50° C und trocknet anschließend ein, löst erneut in 0.7 ml DMF und gibt 5 mg N-Äthyl-N'-dimethyl-aminopropylcarbodiimid-hydrochlorid zu. Nach 2 h bei 40° C werden 50 mg des Triäthylentetraminharzes zugegeben und 3 h bei 40° C gerührt. Nicht umgesetzte Aminogruppen des Harzes werden, wie bereits vorher angeführt, blockiert.

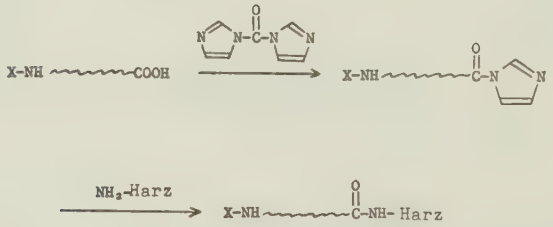

Abbildung 6

δ) Bindung an C-terminales Homoserinlacton (s.unter α):

Bei der Spaltung von Peptidbindungen mit BrCN an Methioninresten entstehen Peptide, deren C-terminale Aminosäure Homoserin bzw. Homoserinlacton ist. Das Lacton kann mit primären Aminogruppen reagieren. 100 Nanomol Peptid, deren C-terminale

Aminosäure Homoserin oder Homoserinlacton ist, werden in 1 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst, 1 h bei Raumtemperatur belassen und dann über KOH getrocknet. Das Peptid wird in 0.15 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit 40 mg in DMF gequollenem Triäthylentetraminharz versetzt. Nach Zugabe von 0.05 ml Triäthylamin wird bei 45° C 2 h gerührt; restliche Aminogruppen werden, wie vorher beschrieben, blockiert.

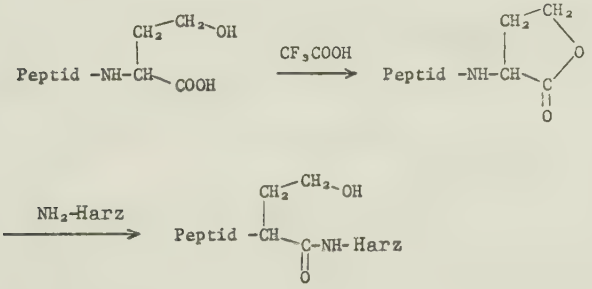

Abbildung 7

ε) Bindung an Isothiocyanatgruppen tragendes Glaspulver (Machleidt et al., 1973)

Diese für größere Peptide (20 - 50 Aminosäuren) beschriebene Methode wurde von mir an einem 23 Aminosäuren enthaltenden tryptischen Peptid erprobt.

200 Nanomol Peptid werden in 0.6 ml Pyridin/Wasser (1:1) gelöst und mit 200 mg von Machleidt zur Verfügung gestellten "Isothiocyanatglas" 5 min umgesetzt. Freie Isothiocyanat-

gruppen werden mit 0.1 ml Äthanolamin blockiert.

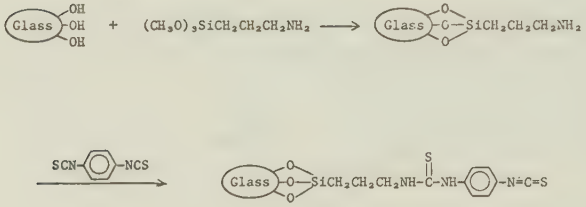

Abbildung 8

(c) Manueller Edmanabbau

Angewendet wurde die von Edman (1970) beschriebene Technik mit 100 Nanomol des tryptischen Peptides T_1. Die Auswertung erfolgte auf Dünnschichtplatten und durch Rückspaltung der PTH-Aminosäuren, wie im folgenden beschrieben wird.

(d) Auswertung der Phenylthiohydantoide

α) Dünnschichtchromatographie

Die Auswertung der vom Proteinsequenator anfallenden Thiohydantoide geschieht auf Dünnschichtplatten (Merck, Kieselgel 60 F 254) nach der aufsteigenden Methode. Als Laufmittel dienen Gemische von Chloroform/Methanol (9:1) zur Trennung der polaren Aminosäurederivate. Die hydrophoben Derivate werden durch n-Heptan/Propionsäure/Dichloräthan (58:17:25) getrennt. Die Identifizierung erfolgt durch Vergleich mit

Referenzderivaten. Die Nachweisgrenze unter UV-Licht liegt etwa bei 10 Nanomol.

Die Mengen der vom Peptidsequenator zu analysierenden Phenylthiohydantoide liegen oftmals unter der Sichtbarkeitsgrenze; um sie dennoch dünnschichtchromatographisch nach der geschilderten Methode nachweisen zu können, wird beim Edmanabbau radioaktiv markiertes ^{3}H-Phenylthiocyanat verwendet. Gemäß den mitaufgetragenen Referenzen werden analoge Positionen auf den Dünnschichtplatten ausgeschnitten, und ihre Radioaktivität wird im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Position, in der sich die Radioaktivität befindet, zeigt die Art des abgebauten Phenylthiohydantoins an. Dadurch ist eine Steigerung der Nachweisgrenze bis auf etwa 1 Nanomol möglich.

β) Rückspaltung

PTH-Aminosäuren werden in 0.2 ml 5,7 n HCl (1 % Mercaptoäthanol) gelöst und unter Stickstoff in Ampullen abgeschmolzen. Nach 24 h bei 130° C bilden sich in unterschiedlichen Ausbeuten die freien Aminosäuren zurück, die auf dem Aminosäureanalysator nachgewiesen werden können.

γ) Gaschromatographie

In Ergänzung zur Dünnschichtchromatographie werden hydrophile Aminosäurederivate im Packard Gaschromatographen (Modell 7400) mit Flammenionisationsdetektor nachgewiesen.
Nach der Methode von Pisano und Bronzert (1969) wird an mit Dimethyldichlorsilan vorbehandelten Glassäulen (1,2 n; 2 mm

Innendurchmesser) getrennt, die mit Chromosorb (100-120 mesh; Supelco) gepackt sind. Trägergas ist Helium (Durchfluß 40 ml/min), die Detektortemperatur beträgt 250° C. Das Temperaturprogramm beginnt mit 165° C für 6 min; anschließend erfolgt eine kontinuierliche Temperaturveränderung von 9°C/min bis zu 275°C. Die untere Nachweisgrenze beträgt etwa 1-5 Nanomol an PTH-Aminosäuren.

δ) Massenspektrometrie

Nach Hagemaier et al. (1970) können die 20 in Proteinen normalerweise vorkommenden Aminosäuren in Form ihrer PTH-Derivate direkt massenspektrometrisch aufgrund ihrer Molekül-Gipfel oder charakteristischer Fragment-Ionen identifiziert werden.
Die Massenspektren wurden an einem Varian CH 7 Gerät aufgenommen, das einen beheizbaren Direkteinlaß besitzt. Bei Temperaturen der Ionenquelle von 150 - 300° C wird in Intervallen von je 30° C jeweils ein Spektrum aufgenommen (Beschleunigung 3,5 kV; Multiplierspannung 1,8 kV; Elektronenenergie 70 eV).

5. Exopeptidasen

Um Teilsequenzen von Peptiden oder des Proteins zusätzlich zum Edmanabbau zu bestätigen, wurde Carboxypeptidase A und B sowie Leucinaminopeptidase (alle Präparate von Merck) benutzt. 5 - 10 Nanomol Peptid werden in 50 µl 0.1 m Boratpuffer, pH 8.0, gelöst und mit 5 µg Exopeptidase versetzt. Bei 37° C

werden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und im Auftragspuffer des Aminosäureanalysators gelöst (Natriumcitrat/HCl, pH 2.2).

3 mg Protein S8 werden in 1 ml des auch für Peptide verwendeten Puffers suspendiert und mit je 30/ug Carboxypeptidase A und B versetzt. Aliquote von 50/ul werden zu verschiedenen Zeiten entnommen und zum Auftrag auf den Aminosäureanalysator gebracht.

III. Röntgenaufnahmen von Fasern

1. Darstellung der Fasern

Die Fasern wurden spontan, ohne Ausnutzung des an Glaskapillaren auftretenden epitaktischen Effekts, erhalten. Neben Fasern des Proteins S8 gelang auch die Darstellung von Fasern des BrCN-Peptids IV.

Beim Einrotieren von konzentrierten Lösungen der Polypeptide bildet sich an der Glaswand ein Film, der bei Lösungsversuchen mit destilliertem Wasser, 20 % Essigsäure oder 70 % Ameisensäure zum Teil unlösliche oder nur bei erhöhter Temperatur lösliche Fasern bildet.

2. Aufnahmetechnik

Die Fasern wurden nach 3 Methoden behandelt:

(a) im Exsikkator über Wasser hydratisiert, um Säurereste zu entfernen, entlang der Faserachse in Quarzkapillaren (Innendurchmesser 0.75 mm) eingeführt, die zu einem kleinen Teil mit Wasser gefüllt sind, und die Kapillare mit Wachs verschlossen;

(b) in Quarzkapillare eingeführt und einem N_2-Strom (15 ml/h) mit konstanter relativer Feuchtigkeit von 75 % (Äthanol/Wasser) ausgesetzt;

(c) auf Mellanfilter aufgezogen und um 0.1 mm gestreckt, sonstige Bedingungen wie unter (b).

Die Aufnahmen wurden an einer umgebauten Präzessionskamera (Fa. Charles Supper) durchgeführt. Durchmesser der Kollima-

torblenden 0.15 mm und 0.30 mm; Kollimatorlänge 150 mm; Belichtung 24 h; Cu. -Strahlung (Nickelfilter); Distanz von Probe zum Film 60 mm; Raumtemperatur. Die Faserachse wird senkrecht zum Primärstrahl ausgerichtet. Zur Kontrolle werden Aufnahmen angefertigt, bei denen die Faserachse waagerecht zum Primärstrahl liegt.

IV. Sedimentation in der Ultrazentrifuge (Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe)

Die Messungen wurden an einer analytischen Spinco Ultrazentrifuge (Modell E) durchgeführt. 1 mg Protein S8 wird in 0.2 ml Puffer (2.5 mM Kakodylsäure, 5 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$) gelöst und in die UZ-Zelle des Spinco Rotors gegeben. Bei 52000 UpM, 20° C, werden mit Hilfe der Schlierenoptik alle 8 min Aufnahmen angefertigt (Schlierenwinkel 70°). Die Photoplatten werden unter dem Meßmikroskop ausgewertet. Die Berechnung des Sedimentationskoeffizienten S_{app} erfolgt nach der graphischen Methode (Elias,1961). Dabei wird logr gegen die Zeit aufgetragen, aus der Steigung (tg) der Geraden (s. Abb.) ergibt sich nach

$$S_{app} = \frac{2.303 \cdot tg\alpha}{60\,\omega^2}$$

der scheinbare Sedimentationskoeffizient S_{app}.

V. Versuche zur Wechselwirkung des Proteins mit der rRNS

1. Spezifische Bindung des Proteins S8 an die 16S rRNS

(a) Rekonstitution des S8-16S rRNS Komplexes: Von Dr. R.A. Garrett zur Verfügung gestellte 16S rRNS wurde in 1.5 ml TMK Puffer (0.03 Tris/HCl, pH 7.4, 0.03 m $MgCl_2$, 0.35 m KCl, 0.006 m Mercaptoäthanol) gelöst und mit fünffach molarem Überschuß an S8 bei 42° C eine Stunde inkubiert. Das Protein wurde vorher, wie unter II.2.e) beschrieben, radioaktiv markiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Folintest nach Lowry et al. (1951) bestimmt und auf Impulse pro Minute umgerechnet.

(b) Nachweis der Komplexbildung: Der Rekonstitutionsansatz wurde auf Eis gekühlt und auf eine bei 2° C mit TMK-Puffer äquilibrierte Agarosesäule (Agarose A 0.5, Biorad, 1 x 30 cm) aufgetragen. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Absorption bei 260 Nanometer ergab den RNS-Gehalt und im Szintillationszähler gemessene Aliquote den Proteingehalt. Die Regionen der beiden Elutionsprofile, die in einem Gipfel zusammenfallen, weisen den Protein-RNS Komplex nach (siehe Resultate). Die Komplex enthaltenden Fraktionen werden mit 1.5-fachem Volumen an Äthanol versetzt und das Präzipitat einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. Entstehende Banden können protein- oder nukleinsäurespezifisch in verschiedenen Gelen angefärbt werden. Das Auftreten einer Bande, die sowohl Protein als auch RNS-Färbung besitzt und sich in ihrem R_f-Wert von dem der freien 16S rRNS unterscheidet, gibt den Protein-RNS Komplex an. Einzelheiten der optimalen

Rekonstitutionsbedingungen und des Nachweises des S8-16S rRNS Komplexes siehe Garrett et al. (1971) und Schulte und Garrett (1972).

2. Behandlung des 16S rRNS / S8 Komplexes mit Trypsin

Der von überschüssigem Protein befreite und mit Äthanol ausgefällte Komplex wird in Tris/HCl Puffer, pH 8.0, gelöst. Aliquote werden bei 0° C, 15° C, 30° C, 37° C und 42° C mit Trypsin im Verhältnis 50:1 und 10:1 je eine Stunde inkubiert. Um nachzuweisen, ob Trypsin auf das im Komplex gebundene Protein einwirken konnte, werden die Lösungen mit doppeltem Volumen Eisessig versetzt, die ausfallende RNS abzentrifugiert und das gelöste Protein einrotiert und dann zum Auftrag auf 15 % Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (siehe Abschnitt Proteinisolierung) gebracht. Als Referenzen dienen unbehandeltes S8 und Trypsin.

C. RESULTATE

I. Primärstruktur des ribosomalen Proteins S8 des Wildtyps

1. Isolierung der tryptischen Peptide

Es wurden drei verschiedene, reproduzierbare Methoden angewendet:

a) Trennung an Sulfoäthylcellulose mit anschließender Papierchromatographie

Nach der Verdauung des Proteins mit Trypsin werden die entstehenden Peptide zuerst von Sulfoäthylcellulose mit einem nichtlinearen Pyridin-Formiat Gradienten eluiert. Die weitere Auftrennung erfolgte papierchromatographisch. Die meisten tryptischen Peptide ließen sich auf diese Weise sauber isolieren. Die Ausbeute der reinen Peptide war unterschiedlich und betrug zwischen 10 und 30 %.
Abbildung 9 zeigt neben der durch den Ionenaustauscher erzielten Trennung auch die R_f-Werte der einzelnen Peptide, wie sie sich aus der Papierchromatographie ergeben.

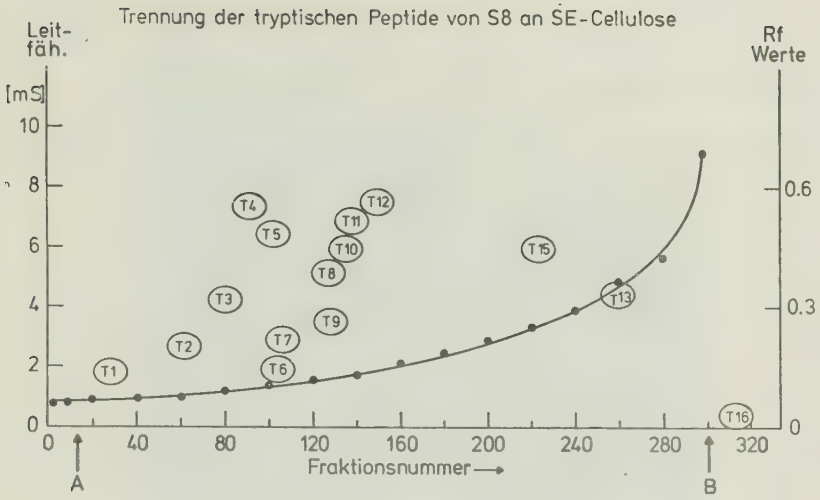

Abbildung 9

Abszisse: Fraktionen mit je 4 ml

Ordinate: Leitfähigkeit (mS) der Fraktionen und R_f-Werte der Peptide nach der Papierchromatographie. Bei A beginnt ein Puffermischgerät mit 8 Gefäßen zu je 150 ml mit folgenden Pyridin-Formiat Puffern:

Molarität	pH
0.01	2,6
0.02	2,8
0.03	3,0
0.04	3,1
0.06	3,3
0.08	3,5
0.16	4,1

Bei B beginnt ein Puffer aus 30 % Pyridin und 50 % Essigsäure.

b) Fingerprint

In Abbildung 10 sind die tryptischen Peptide auf einem Fingerprint durch Besprühen mit Ninhydrin sichtbar gemacht.
Das Peptidgemisch wurde in horizontaler Richtung elektrophoretisch und anschließend in der dazu senkrechten Richtung durch absteigende Papierchromatographie getrennt.
Methioninhaltige Peptide wie T3, T4 und T7 liegen zum Teil in oxydierter Form vor (Methioninsulfon) und ergeben daher oftmals zwei Flecken. Peptid T13 (mit der C-terminalen Sequenz ... Lys-Arg, siehe Abb.13) liegt nach der enzymatischen Spaltung zum Teil ohne Arginin vor und ergibt aus diesem Grund zwei Flecken. Das Peptid T1 bildet nur eine sehr schwache Färbung mit Ninhydrin aus.
Beim vorliegenden Fingerprint wurde das Protein 20 Stunden mit Trypsin (Enzym:Substrat, 1:100) gespalten. Bei wesentlich kürzeren Verdauungszeiten wird die Bindung des Peptids T2 an das im Protein folgende Peptid T16 (siehe Abb.13) weit weniger quantitativ gespalten. Die Peptide T2 und T16 liegen dann überwiegend ungespalten in einem T2 und T16 enthaltenden Peptid vor.
Fingerprints, die zur präparativen Gewinnung von Peptiden benutzt wurden, lieferten Ausbeuten zwischen 100 und 200 Nanomol pro Peptid, bei Auftrag von etwa 300 Nanomol Proteinhydrolysat.
Um die freien Aminogruppen nicht zu zerstören, wurde die Lage der Peptide dabei nicht durch den Ninhydrin-Test ermittelt, sondern durch Auflegen eines Films nach vorhergehender radioaktiver Markierung der Peptide (siehe Material und Methoden, II.3.).

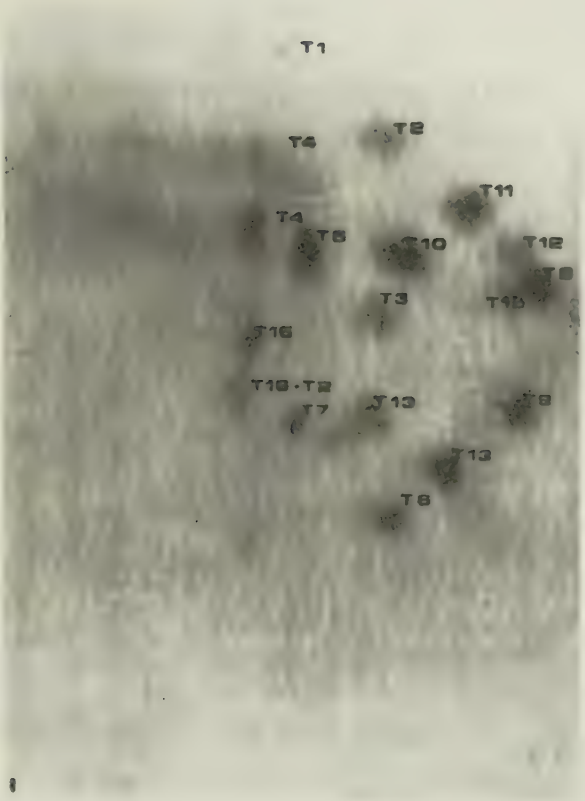

Abbildung 10

Fingerprint der tryptischen Peptide des Proteins S8 (Wildtyp)

c) Gelfiltration der tryptischen Peptide

Die Trennung der tryptischen Peptide auf Sephadex G15 gestattete die saubere Isolierung des im ersten Gipfel (siehe Abb.11) enthaltenen Peptids T16 sowie eine Vortrennung der restlichen Peptide.

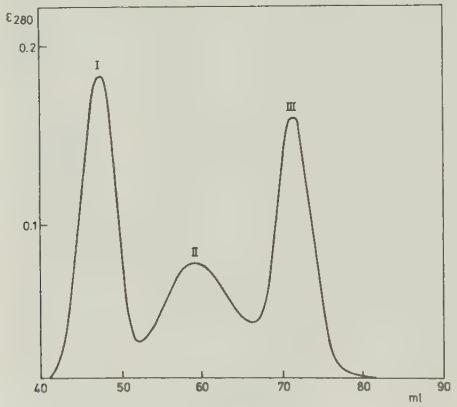

Abbildung 11

Trennung der tryptischen Peptide auf Sephadex G15

Abszisse: Elutionsvolumen (in ml)
Ordinate: Absorption bei 280 nm

Gipfel I : Peptid T16
Gipfel II : 8-12 Aminosäuren enthaltende Peptide
Gipfel III: Peptide mit weniger als 8 Aminosäuren

	Cys	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Se[1]
T1	0,8				1,08			1,10	0,94		0,98	0,96	0,90					7
T2		0,98						1,93	1,91		1,02	0,97				1,07		8
T3			0,89	2,07		1,0		2,11	0,94	0,93						1,04		9
T4		2,09	0,97	0,94	1,06	1,0		1,02		1,87	1,04	0,98					0,96	12
T5				1,02	2,02			1,04	1,96		0,97						1,00	8
T6		2,02			1,04		1,08	2,03								1,00		7
T7		0,97	0,88				1,09		0,98	0,93							1,00	6
T8												1,02				1,00		2
T9								1,04									1,00	2
T10					0,95		1,06						0,92	1,01		1,00		5
T11											1,04		0,93			1,00		3
T12											0,98						1,00	2
T13		1,01			1,04	1,0						1,00				1,97	1,04	7
T15				1,04		1,0	1,06		0,97			0,99					1,91	7
T16		2,04	1,91	0,2	5,73	1,0	2,31	0,34	1,08	0,15	1,02	3,00		2,04		3,12		23
Σ[1]	1	9	5	5	13	5	6	10	9	4	7	9	3	3		11	8	108[2]

Tabelle 1: Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide
Mittelwerte der nach verschiedenen Methoden isolierten Peptide

1) auf ganze Zahlen abgerundete Werte
2) Das Protein enthält insges. 109 Aminosäuren, ein bei der tryptischen Spaltung entstehendes freies Lysin ist in der Tabelle nicht aufgeführt.

2. Sequenzen der tryptischen Peptide

Mit Ausnahme der Peptide T1, T4, T16 gelang die Sequenzierung sämtlicher tryptischer Peptide im Festphasensequenator. Peptide mit C-terminalem Lysin wurden über ihre ε-Aminogruppe mit p-Phenyldiisothiocyanat kovalent an Aminopolystyrolharz gebunden und dem Edmanabbau unterworfen (Lysinmethode, Einzelheiten siehe Material und Methoden 4.b.α). Bei Peptiden mit C-terminalem Arginin wurde die Guanidinogruppe mit Hydrazin umgewandelt und das entstehende Ornithin nach der Lysinmethode an Harz gebunden (Argininmethode, siehe Material und Methoden 4.b.ß).

Der Edmanabbau im nach Wittmann-Liebold modifizierten Proteinsequenator ergab die Primärstrukturen der Peptide T4 und T16 und bestätigte einen Großteil der im Peptidsequenator ermittelten Sequenzen.

Im folgenden werden die Einzelergebnisse aufgeführt, die Peptide sind gemäß ihrer Reihenfolge im Protein angeordnet.

T4 : Ser - Met - Gln - Asp - Pro - Ile - Ala - Asp - Met - Leu - Thr - Arg
Proteinsequenator (N-terminaler Abbau des Proteins)

T12 : Ile - Arg
Die Sequenz ergibt sich aus der Bruttoanalyse und der Trypsin-Spezifität; sie wurde durch Proteinsequenatorergebnisse bestätigt

T6 : Asn - Gly - Gln - Ala - Ala - Asn - Lys
Peptidsequenator (Lysinmethode), Proteinsequenator (N-terminaler Proteinabbau)

T3 : Ala - Ala - Val - Thr - Met - Pro - Ser - Ser - Lys
Peptidsequenator (Lysinmethode), Proteinsequenator (N-terminaler Proteinabbau)

T8 : Leu - Lys
Die Sequenz ergibt sich aus der Bruttoanalyse und der Trypsin-Spezifität; sie wurde durch Proteinsequenator-ergebnisse bestätigt.

T2 : Val - Ala - Ile - Ala - Asn - Val - Leu - Lys
Peptidsequenator (Lysinmethode), Proteinsequenator (N-terminaler Proteinabbau)

T16 : Glu - Glu - Gly - Phe - Ile - Glu - Asp - Phe - Lys - Val - Glu - Gly - Asp - Thr - Lys - Pro - Leu - Glu - Leu - Thr - Leu - Lys
Es wurde zunächst mehrmals versucht, dieses Peptid nach der Lysinmethode im Peptidsequenator zu sequenzieren, jedoch ohne Erfolg. Versuche, das Peptid über Carboxylgruppen nach der Carbodiimidmethode (s.Material und Methoden 4.b.γ) an Harz zu binden und anschließend abzubauen, blieben ebenso ohne Resultat wie auch der Abbau nach Bindung des Peptids an Isothiocyanatgruppen tragendes Glaspulver (s. Material und Methoden 4.b.ε).
Der Abbau im Proteinsequenator, nachdem die 3 Lysine des Peptids zur Vermeidung von Elutionsverlusten mit hydrophilen Senfölderivaten modifiziert wurden, ergab die eindeutige Aufklärung der Primärstruktur bis zum C-Terminus.

T10 : Tyr - Phe - Glu - Gly - Lys
Peptidsequenator (Lysinmethode)

T5 : Val - Val - Ala - Glu - Ile - Ser - Gln - Arg
Peptidsequenator (Argininmethode); N-terminale Sequen-

zen durch Leucinaminopeptidase bestätigt

T15 : Val - Ser - Arg - Pro - Gly - Leu - Arg

Peptidsequenator (Argininmethode); N-terminale und C-terminale Sequenzen durch Exopeptidasen bestätigt

T11 : Ile - Tyr - Lys

Peptidsequenator (Lysinmethode)

T13 : Leu - Gln - Asp - Lys - Pro - Lys - Arg

Peptidsequenator (Lysinmethode)

T7 : Val - Met - Gly - Asp - Thr - Arg

Peptidsequenator (Argininmethode); durch Exopeptidase bestätigt

T9 : Ala - Arg

Die Sequenz ergibt sich aus der Bruttoanalyse und der Trypsin-Spezifität

T1 : Leu - Gln - Ile - Cys - Val - Ala - Tyr

Die Sequenzierung von T1 im Peptidsequenator nach Bindung der C-terminalen Carboxylgruppe an Harze mit der Carbodiimidmethode gelang nicht. Daher wurde der Edmanabbau manuell vollzogen.

Die ersten 5 Aminosäuren konnten so als PTH-Derivate nachgewiesen werden. Die Primärstruktur von T1, das als einziges tryptisches Peptid kein Arginin oder Lysin enthält und deshalb den C-Terminus des Proteins einnehmen muß, konnte durch enzymatische Behandlung des Proteins mit Carboxylpeptidase A und B erstellt werden. Diese Exopeptidasen setzen Aminosäuren, je nach Art und Entfernung vom C-Terminus, in zeitlich unterschiedlichen Raten frei. Aus dem Vergleich der Ausbeuten der einzelnen

Aminosäuren in Abhängigkeit von der Zeit resultiert diese Sequenz.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ergab dieser Versuch außerdem die Stellung zweier Aminosäuren vor Peptid T1.

t(min)	Nanomol freigesetzte Aminosäuren (abgerundet)								
	Tyr	Ala	Val	Cys	Ile	Gln	Leu	Lys	Arg
2	5	3	2	-	-	-	-	-	-
5	10	8	7	-	-	-	-	-	-
10	11	11	11	1	-	-	-	-	-
30	12	12	12	5	3	-	-	-	-
60	15	15	15	10	8	2	-	-	-
120	15	15	15	15	15	10	10	5	-
240	15	15	15	15	15	15	15	10	5

Tabelle 2: Verdauung des Proteins S8 mit Carboxydase A und B

Aus der vorstehenden Tabelle ergibt sich folgende C-terminale Sequenz des Proteins S8:

... Arg-Lys-Leu-Gln-Ile-Cys-Val-Ala-Tyr-COOH
T1

Um die Position des Cysteins im Peptid T1 zu bestätigen, wurde das Protein mit Äthylenimin behandelt, Cystein geht dabei in das S-Aminoäthylderivat über; dieses wird von Trypsin gespalten. Bei der Trennung der tryptischen Peptide des so umgesetzten Proteins mit der Fingerprinttechnik können zwei, bei unbehandeltem Protein nicht vorhandene Peptide identifiziert werden, während der T1 entsprechende Fleck fehlt. Die Bruttoanalysen dieser beiden Peptide bestätigen die Stellung des Cysteins in T1 und die Verteilung der übrigen Aminosäuren von T1 auf die beiden Teilbereiche vor und nach dem Cystein.

3. Bromcyan-Peptide

a) Isolierung

Die nach chemischer Spaltung des Proteins mit Bromcyan entstehenden Peptide (s. Material und Methoden) wurden in 36 % Essigsäure und 6-molarem Harnstoff an Sephadex G25 getrennt. Ohne Zusatz von Harnstoff wird eine wesentlich schlechtere Fraktionierung, wie die aus Abb.12 ersichtliche, erhalten. Der Grund dafür dürfte in der Neigung der BrCN-Peptide, stabile Aggregate zu bilden, zu suchen sein.

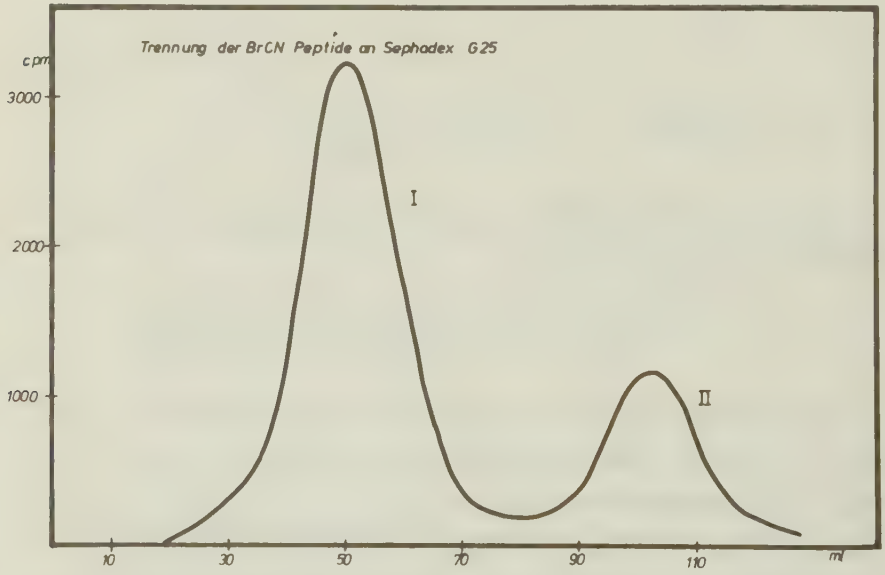

Abbildung 12

Abszisse: Elutionsvolumen (ml)
Ordinate: cpm = Impulse/Min
Das Protein wurde vor der Spaltung mit BrCN radioaktiv markiert. Aliquote jeder Fraktion wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.
Gipfel I: enthält das BrCN-Peptid IV
Gipfel II: enthält das Gemisch der restlichen BrCN-Peptide I, II, III und V.

Bei der Trennung der im zweiten Gipfel enthaltenen Peptide nach der Fingerprintmethode wurden 4 Peptide identifiziert. Die Aminosäureanalyse ergab folgende Werte, die auf ganze Zahlen aufgerundet sind:

BrCN I : Ser_1, $Homoser_1$

BrCN II : Asp_2, Glu_1, Pro_1, Ala_1, Ile_1, $Homoser_1$

BrCN III : Asp_2, Thr_1, Glu_1, Gly_1, Ala_4, Val_1, Ile_1, Leu_1, Lys_1, Arg_2, $Homoser_1$

BrCN V : Asp_1, Thr_1, Glu_1, Gly_1, Ala_2, Val_1, Ile_1, Leu_1, Tyr_1, Lys_1, Arg_2, Cys_1

Die römischen Zahlen entsprechen der Reihenfolge der Peptide in der ermittelten Primärstruktur (s. Abb.13).

b) Sequenzierung des BrCN-Peptides IV

Das aus dem ersten Gipfel der Gelfiltration stammende Peptid wurde tryptisch nachgespalten, das Gemisch der entstehenden Peptide mit der Fingerprinttechnik getrennt und die Aminosäurezusammensetzung analysiert. Neben den bereits bekannten tryptischen Peptiden T8, T2, T16, T10, T5, T15, T11 und T13 wurden zwei Peptide mit der Zusammensetzung Ser_2, Pro, Lys und Val_1, $Homoser_1$ gefunden.

Zur weiteren Sequenzermittlung wurde das Bromcyan-Peptid IV dem Edmanabbau im Proteinsequenator unterworfen. Bei einem Ausgangsmaterial von 0,5 µMol konnten die PTH-Aminosäuren von 42 Zyklen ausgewertet werden. In Übereinstimmung mit den bereits vorliegenden Sequenzen der tryptischen Peptide ergab sich daraus, daß dieses Peptid mit der Teilsequenz des tryptischen Peptides T3, Pro-Ser-Ser-Lys,beginnt und sich T8-T2-T16-T10 anschließen.

Das gleiche Peptid wurde über seine C-terminale Homoserinlacton-Gruppe an Harz gebunden bzw. über die ε-Lysingruppe an modifiziertes Glaspulver (s. Material und Methoden 4.b.δ und ε) und im Peptidsequenator abgebaut. Obwohl etwa je 200-300 Nanomol Peptid eingesetzt wurden, war nach 5 bis 10 Zyklen eine Auswertung nicht mehr möglich.

4. N-terminaler Edmanabbau des Proteins

Von 300 Nanomol Protein S8 ausgehend, konnten im Proteinsequenator die PTH-Aminosäuren der ersten 35 Zyklen eindeutig identifiziert werden. Die nächsten 15 Aminosäuren konnten nur teilweise bestimmt werden, z.B. Phenylalanin in Position 44 und 48. Aus den Ergebnissen im Proteinsequenator ergab sich, daß Protein S8 mit Peptid T4 beginnt und sich die Peptide T12, T6, T3, T8 und T2 anschließen.

5. Bestimmung der Reihenfolge der tryptischen Peptide im Protein

Nach der Klärung der Sequenzen sämtlicher tryptischer Peptide mußte ihre Reihenfolge im Protein ermittelt werden.

a) Proteinsequenator

Die sich ergänzenden Ergebnisse des am Protein und Bromcyanpeptid IV durchgeführten Abbaus im Proteinsequenator ergaben bereits die Reihenfolge der ersten 8 tryptischen Peptide zu:

T4 - T12 - T6 - T3 - T8 - T2 - T16 - T10

Für die Bromcyanpeptide ergibt sich gleichzeitig ihre Reihenfolge im Protein zu: I - II - III - IV.

Das Bromcyan-Peptid IV enthält neben den tryptischen Peptiden T3, T8, T2, T16 und T10 noch T5, T15, T11, T13, deren Zuordnung sich aus chymotryptischen Peptiden und Thermolysin-Peptiden ermitteln ließ. Es enthält außerdem ein Peptid Val_1, $Homoser_1$, das nur von Peptid T7 stammen kann, denn dieses enthält als einziges der restlichen Peptide Methionin.
Nachdem die Reihenfolge der Bromcyan-Peptide I bis IV gesichert ist, kann sich Bromcyan-Peptid V nur C-terminal anschließen; ein Hinweis auf diese Position ist auch das Fehlen von Homoserin in der Bruttoanalyse des Peptids.
Von den tryptischen Peptiden sind den BrCN-Peptiden nur T1 und T9 noch nicht zugeordnet, sie können nur in BrCN-Peptid V enthalten sein. Der C-terminale Teil des Peptids T7 muß den N-Terminus dieses BrCN-Peptids bilden. Das Peptid T1 wurde bereits als C-terminales tryptisches Peptid des Proteins erkannt (s. Resultate, 2., Sequenzen der tryptischen Peptide).

Die Verdauung des Proteins mit Carboxypeptidase A und B ergab ein auf das N-terminale Leucin des Peptids T1 folgendes Lysin. Die Bruttoanalyse des BrCN-Peptids V bestätigte dieses Lysin. Das Peptid T9 kann nach den geschilderten Befunden nur zwischen dem erwähnten Lysin und dem Peptid T7 liegen.

b) Chymotrypsin

Chymotryptische Peptide wurden nach der Fingerprint-Technik und durch Säulenchromatographie mit Sulfoäthylcellulose getrennt. Die werte der Aminosäureanalysen gibt Tabelle 3. In der ersten Spalte ist die Position der Peptide innerhalb der Gesamtsequenz wiedergegeben.

c) Thermolytische Peptide wurden nach der Fingerprintmethode getrennt. Aus den Aminosäureanalysen (Tabelle 4) konnten für die Zuordnung der tryptischen Peptide wichtige Brücken, z.B. T11-T13, T9-T1, erkannt werden.

d) Staphylococcus-Protease

Wegen einer im Enzym enthaltenen Verunreinigung mit Trypsin wurde das Protein neben den Protease-spezifischen Stellen (Carboxylgruppe von Glutaminsäuren) auch an tryptischen Spaltstellen hydrolysiert. Die Bruchstücke der Glutaminsäure-haltigen tryptischen Peptide T16 und T5 konnten identifiziert werden. Dies ergab eine zusätzliche Bestätigung der in Abb.13 angegebenen Sequenz.

e) Tryptische Spaltung an Argininen nach Blockieren der Lysine

Wie aus der Primärstruktur des Proteins ersichtlich, konnte diese Methode wegen der ungünstigen Lage der Lysine (von Pos. 15 bis 75 kein Lysin) keinen wesentlichen Beitrag zur Überlappung der tryptischen Peptide liefern. Die nach der Fingerprintmethode identifizierbaren tryptischen Peptide T15, T7, T9 zeigen lediglich, daß die ihnen vorausgehenden tryptischen Peptide C-terminales Arginin besitzen müssen.

Position	T*	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
1 - 10	aus T4	2,03		0,94	1,05	1,0		0,93		1,84	1,00	1,03					
21 - 31	T6- T3 -T8		0,92	1,84		1,0		1,91	0,98	0,93		1,00				2,10	
32 - 39	T8 - T2	1,02						1,90	1,82		0,99	1,00				1,04	
40 - 44	aus T16				2,12		1,03							1,00		1,05	
45 - 48	aus T16	0,96			1,04						1,01			1,00			
61 - 64	T16-T10		0,95									1,01	0,92			1,08	
66 - 82	T10-T5-T15			1,90	3,21	1,0	2,24	0,97	2,75		0,98	1,00				1,09	1,93
83 - 85	T15-T11										1,03		0,90				1,00
86 - 95	T11-T13-T7	1,07			1,09	1,0			1,05	0,86		1,00				2,88	1,03
96 -103	T7-T9-T1	1,10	0,86				1,12	0,89				1,00				1,12	1,89

Tabelle 3: Aminosäureanalysen der chymotryptischen Peptide

T* = Zuordnung der tryptischen Peptide

Position	T*	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg
1 - 5	aus T4	1,01		1,07	1,00	1,0				0,85							
6 - 9	"	0,98						1,04		0,90	1,00						
10 - 12	"		0,95									1,00					1,02
13 - 17	T12-T6	1,05			1,11		1,12				1,00						0,90
18 - 21	aus T6	1,00						1,95								1,09	
24 - 30	aus T3		0,90	1,86		1,0			0,98	0,91						1,00	
44 - 47	aus T16	0,92			1,09						1,00			0,96			
48 - 59	"	1,04	0,92		3,22	1,0	1,15		0,94			1,00		1,02		2,05	
60 - 61	"		0,90									1,00					
62 - 64	T16-T10											1,00	0,88			1,10	
65 - 68	aus T10				1,10		1,14							1,00		1,09	
73 - 76	aus T5			0,88	1,07						1,00						0,96
77 - 83	T15			0,99		1,0	1,18		1,04		1,00						1,98
84 - 93	T11-T13	1,08			1,12	1,0					1,00	1,02	0,89			3,24	0,87
100 -104	T9 -T1				1,09			0,90				1,00				1,05	1,02

Tabelle 4: Aminosäureanalyse der thermolytischen Peptide

T* = Zuordnung der tryptischen Peptide

6. Erstellung der Gesamtsequenz

Sie basiert auf folgenden Einzelergebnissen:

a) Isolierung und Sequenzermittlung der tryptischen Peptide.

b) Automatischer, stufenweiser Edmanabbau am Gesamtprotein bis Position 40.

c) Lückenlose Isolierung, Analyse und tryptische Nachspaltung der Bromcyanpeptide.

d) Automatischer, stufenweiser Edmanabbau an Bromcyan-Peptid IV, den Positionen 27 bis 68 der Gesamtsequenz entsprechend.

e) Isolierung und Analyse von Fragmenten nach Chymotrypsin- und Thermolysinspaltung des Proteins, dadurch war die Zuordnung der nach Position 68 folgenden tryptischen Peptide möglich.

f) Die Sequenz des C-terminalen Bereiches, Position 96 bis 109, wurde zusätzlich durch Analyse des Bromcyan-Peptides V und Exopeptidasenabbau ermittelt.

7. Primärstruktur

In Abbildung 13 ist die resultierende Primärstruktur einschließlich der wichtigsten isolierten Peptide dargestellt (Stadler, 1974).

Das Protein enthält 109 Aminosäuren der Zusammensetzung Asp_6, Asn_3, Thr_5, Ser_5, Glu_7, Gln_6, Pro_5, Gly_6, Ala_{10}, Val_9, Met_4, Ile_7, Leu_9, Tyr_3, Phe_3, Lys_{12}, Arg_8, Cys_1. Die Abwesenheit der Aminosäure Tryptophan wurde aus der Totalhydrolyse des Proteins mit p-Toluolsulfonsäure (siehe Material und Methoden) ermittelt. Cystein wurde nach Oxydation des Proteins mit Perameisensäure (Mueller, 1951) aus dem Hydrolysat quantitativ mit dem Aminosäureanalysator als Cysteinsäure bestimmt.

Den 13 sauren stehen 20 basische Aminosäuren gegenüber. Damit in Übereinstimmung ist der gemessene isoelektrische Punkt von pH 9.2 (Kaltschmidt, 1971). Der N-terminale Teil des Proteins enthält überwiegend hydrophobe, vereinzelt auch basische Aminosäuren, der mittlere Teil eine auffallende Häufung von sauren Aminosäuren. Der C-terminale Bereich weist dagegen zahlreiche basische Seitenketten vor. Die Peptidbindung zwischen dem Lysin der Position 49 und dem Valin der Position 50 wird von Trypsin nicht gespalten. Der Grund könnte in der für diesen Bereich postulierten helikalen Sekundärstruktur liegen (siehe folgenden Abschnitt III).

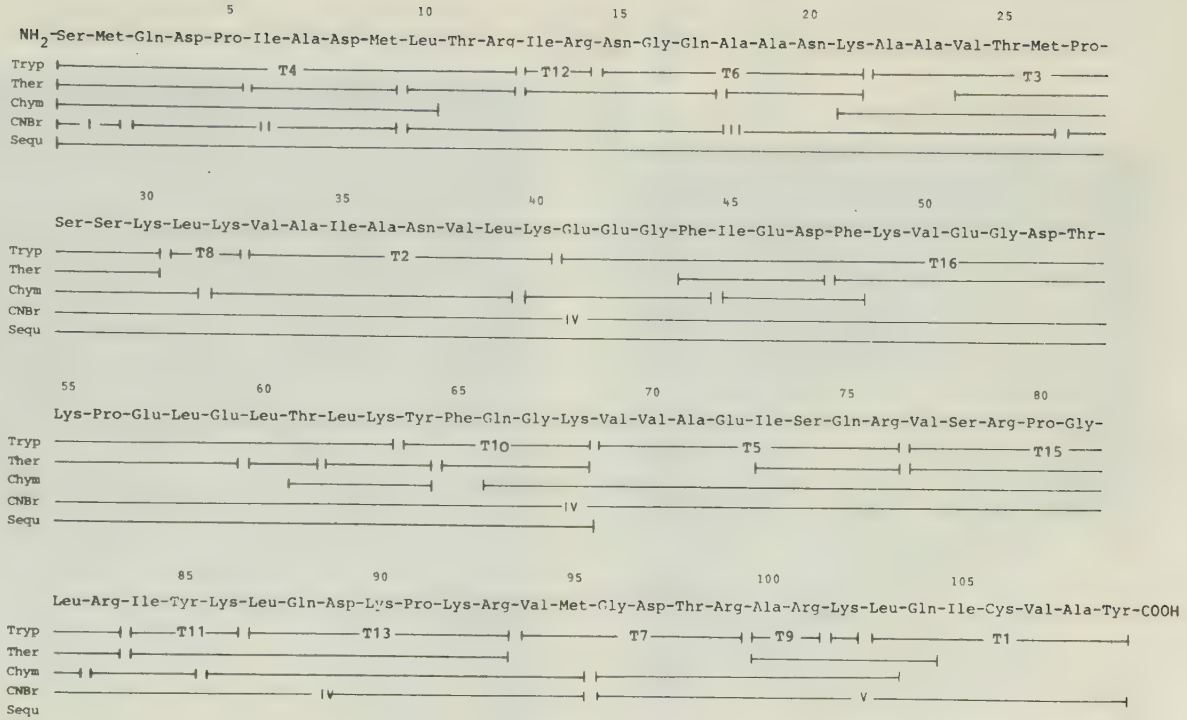

Abbildung 13: Aminosäuresequenz des ribosomalen Protein S8 von Escherichia coli

Tryp = Tryptische Peptide, Ther = Thermolysin Peptide, Chym = Chymotryptische Peptide CNBr = Peptide nach der Spaltung mit Bromcyan, Sequ = Sequenzbereiche, die durch Proteinsequenatorergebnisse bestätigt sind.

II. Primärstruktur der S8-Proteine aus den Mutanten

Nach dem Behandeln von E.coli-Zellen mit Nitrosoguanidin und einem auf gestörte Proteinbiosynthese gezielten Ausleseprozeß konnten Apirion, Phillipps und Schlessinger(1969) temperatursensitive E.coli-Stämme isolieren, von denen vermutet wurde, daß sie in einem oder mehreren ribosomalen Bestandteilen mutiert sind.

Zwei dieser Mutanten wurden von Zubke et al. (1974) mit immunologischen Methoden und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese als im ribosomalen Protein S8 verändert erkannt.

Neben dem genetischen Interesse kann die Aufklärung der Aminosäureaustausche der S8-Proteine der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein Aufschluß über die Funktion dieses Proteins im Ribosom liefern (siehe Diskussion).

Die Abbildungen 14-16 zeigen die veränderte Wanderung der mutierten S8-Proteine, im Vergleich zum Wildtyp, auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Aufgetragen sind die Gesamtproteine der 30S Untereinheiten. Die Lage der S8-Proteine der Mutanten ist durch Pfeile gekennzeichnet; bei der Mutante N4128 ist die Position, die dem S8-Protein des Wildtyps entsprechen würde, gepunktet eingezeichnet. Im Vergleich zum Wildtyp ist S8 der Mutante N4003 schwach nach links verschoben, das S8 der Mutante N4128 stark nach rechts. Das bedeutet eine stärker saure (oder schwächer basische) Ladung des S8-Proteins von N4003 und eine stärker basische (oder schwächer saure) Ladung des S8-Proteins von N4128.

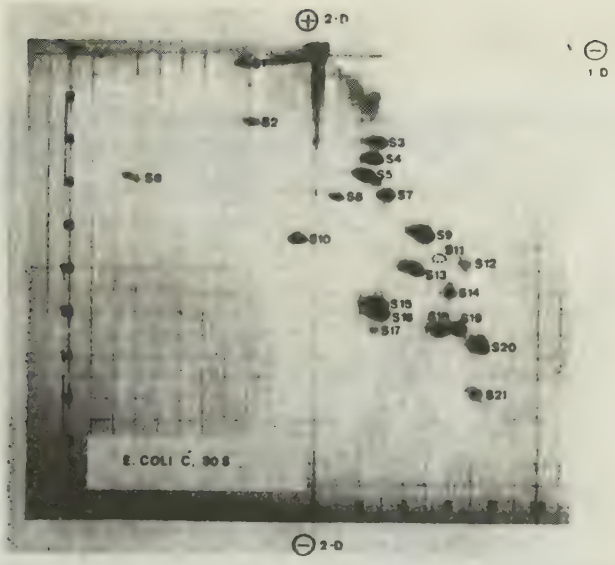

Abb. 14: Proteine der 30S Untereinheit des Wildtyps

Abb. 15: Proteine der 30S Untereinheit der Mutante N4128

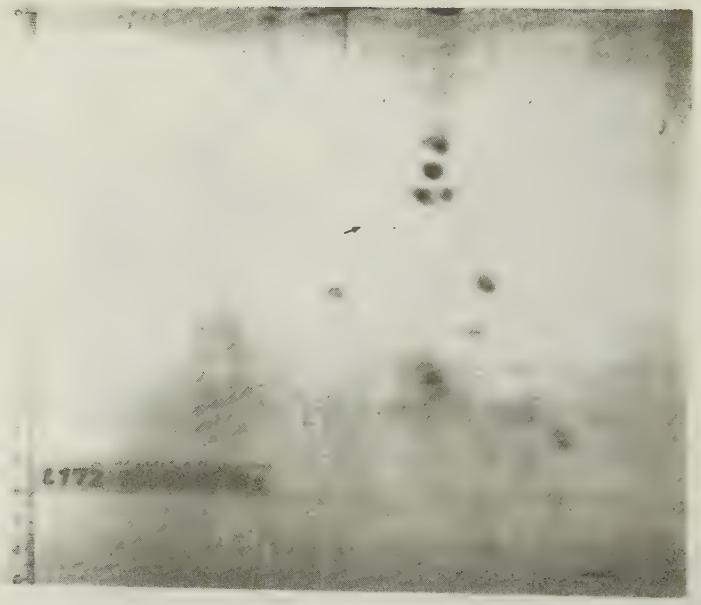

Abb. 16: Proteine der 30S Untereinheit der Mutante N4003

1. Protein S8 der Mutante N4128

a) Fingerprint

Der in Abbildung 17 gezeigte Fingerprint der tryptischen Peptide ergab mehrere Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 10).

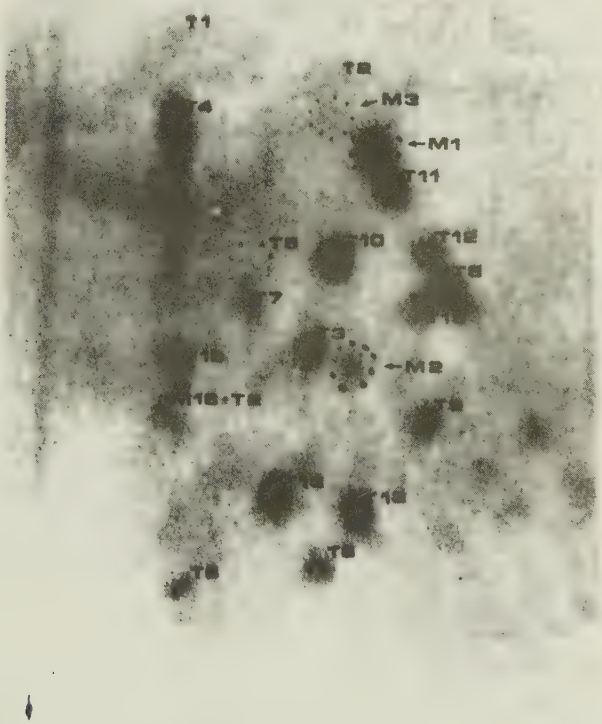

Abb. 17: Fingerprint der tryptischen Peptide des Proteins S8 der Mutante N4128

Peptid T5 (gepunktet) ist verschwunden, neue Flecken M1, M2, M3, sind entstanden. Die relativen Lagen aller anderen Peptide stimmen mit den Wildtyppositionen überein.

b) Aminosäureanalysen

Die Analyse des Flecks M1 ergab ein Peptid der Zusammensetzung Thr,Leu_2,Lys.

Aus Fleck M2 wurde ein Peptid Ser,Glu,Ile,Arg erhalten.

Der mit M3 bezeichnete Fleck ergab, neben einer von T2 herrührenden Verunreinigung, ein Peptid der Zusammensetzung Ala,Val_2,Lys.

Aus M16 resultierte eine Analyse, die sich von Peptid T16 des Wildtyps, durch das Fehlen eines Threonins, einer Glutaminsäure und zweier Leucine unterscheidet.

Alle anderen Peptide ließen in ihrer Zusammensetzung keinen Unterschied zum Wildtyp erkennen.

c) Carboxypeptidaseversuche

Das Peptid M16 wurde auf Sephadex G15 isoliert, die C-terminale Sequenz nach Verdauung mit Carboxypeptidase A und B ergab sich zu:

$$NH_2\text{-Glu-Leu-Lys-COOH}$$

Das S8-Protein der Mutante wurde ebenso mit den Carboxypeptidasen A und B versetzt, dabei konnte Peptid T1 und das in der Sequenz vorausgehende Lysin der Position 102 als unverändert nachgewiesen werden.

d) Proteinsequenator

Beim Abbau des Bromcyanpeptids IV des S8-Proteins der Mutante im Proteinsequenator, konnten die Zyklen bis Position 62 ausgewertet werden. In Position 59 wurde anstelle einer Glutaminsäure des Wildtyps ein Lysin gefunden.

e) Schlußfolgerung

Position 59 des S8-Proteins der Mutante enthält nicht wie der Wildtyp eine Glutaminsäure, sondern ein Lysin. Dadurch entsteht bei der tryptischen Spaltung das auf dem Fingerprint nachgewiesene Peptid M1 der Sequenz NH_2-Leu-Thr-Leu-Lys-COOH.

Das Peptid T5 des Wildtyps mit der Sequenz

NH_2-Val-Val-Ala-Glu-Ile-Ser-Gln-Arg-COOH

entsteht bei der tryptischen Verdauung des mutierten Proteins nicht, dagegen zwei neue Peptide mit den Zusammensetzungen Ala,Val_2,Lys (M3) und Ser,Glu,Ile,Arg (M1), die nur entstehen können, wenn die Glutaminsäure in Peptid T5 zu einem Lysin mutiert ist.

Damit unterscheidet sich das S8-Protein der Mutante N4128 vom S8-Protein des Wildtyps durch zwei gleichartige Punktmutationen (s. Abb. 18), die auch das veränderte Wanderungsverhalten des mutierten Proteins auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese erklären.

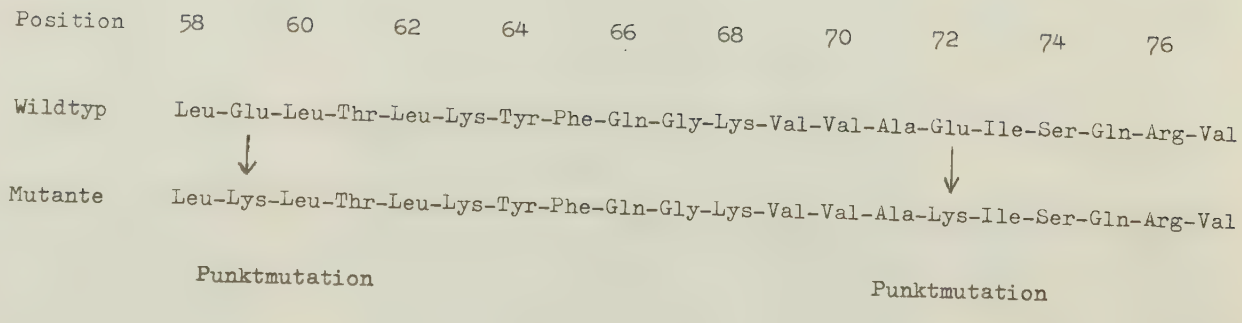

Abb. 18: Veränderte Sequenzbereiche des Proteins S8 der Mutante N4128

2. Protein S8 der Mutante N4003

Auf dem in Abbildung 19 gezeigten Fingerprint sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp ersichtlich.

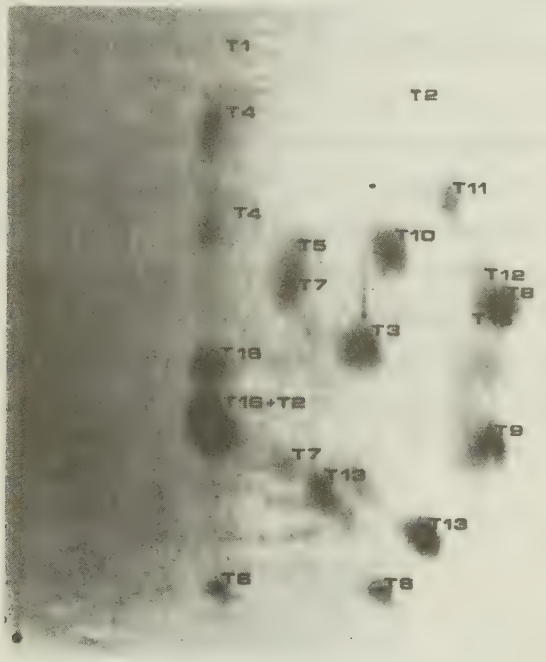

Abb. 19: Fingerprint der tryptischen Peptide des Proteins S8 der Mutante N4003

Neben der relativen Lage der Peptide konnte auch aus den Aminosäureanalysen sämtlicher Flecken ein Unterschied zum Wildtyp nicht ermittelt werden. Durch N-terminalen Abbau des Proteins und des Bromcyan-Peptids IV im Proteinsequenator wurden bis Position 65 dem Wildtyp identische Sequenzen analysiert.

Die Sequenz des auf der Peptidkarte kaum sichtbaren Peptids T1, einschließlich des Lysins der Position 102 der Wildtypsequenz, wurde durch Behandlung des Proteins mit Carboxypeptidase A und B als unverändert ermittelt. Das in T1 enthaltene Cystein wurde zusätzlich durch Totalhydrolyse des Proteins, nach vorausgehender Oxydation mit Perameisensäure, als Cysteinsäure nachgewiesen.

Das veränderte Wanderungsverhalten des S8-Proteins der Mutante N4003 auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte nicht erklärt werden. Die Veränderung kann z.B. durch eine Methylierung von Lysin oder Arginin hervorgerufen werden, die mit den geschilderten Methoden nicht entdeckt werden konnte. Diesbezügliche Untersuchungen konnten wegen Materialmangels nicht durchgeführt werden. Die aufwendige Isolierung gestattete nur eine Ausbeute von 1 uMol.

III. Voraussage der Sekundärstruktur aufgrund der Primärstruktur

Nach Chou und Fasman (1974) können α-Helixbereiche, ß-Struktur und ungeordnete Bezirke (random coil) in einem Protein bei bekannter Aminosäuresequenz mit etwa 80 % Wahrscheinlichkeit richtig vorausgesagt werden. Die Autoren ermittelten aus etwa 15 Proteinen bekannter Sekundär- und Tertiärstruktur Parameter P_α und P_β, die die Häufigkeit des Auftretens einzelner Aminosäuren in bestimmten Sekundärstrukturen widerspiegeln.
Unter Anwendung der von Chou und Fasman erstellten Regeln wurde für das Protein S8 folgende Sekundärstruktur postuliert:

Position	1 - 8	ungeordnet	
"	9 - 13	ß-Struktur	$\bar{P}_\beta = 1{,}32 \geq \bar{P}_\alpha$
"	17 - 26	α-Helix	$\bar{P}_\alpha = 1{,}22 \geq \bar{P}_\beta$
"	30 - 51	"	$\bar{P}_\alpha = 1{,}24 \geq \bar{P}_\beta$
"	57 - 63	"	$\bar{P}_\alpha = 1{,}37 \geq \bar{P}_\beta$
"	68 - 73	"	$\bar{P}_\alpha = 1{,}22 \geq \bar{P}_\beta$
"	74 - 85	ungeordnet	
"	86 - 90	α-Helix	$\bar{P}_\alpha = 1{,}15 \geq \bar{P}_\beta$
"	91 - 102	ungeordnet	
"	103 - 109	ß-Struktur	$\bar{P}_\beta = 1{,}32 \geq \bar{P}_\alpha$

Die Konformationsparameter P ergeben sich als Quotient der Häufigkeit des Auftretens einzelner Aminosäuren in Helix-, ß- oder ungeordneten Regionen mit dem prozentualen Anteil $\bar{f}$ dieser Sekundärstrukturen an der Gesamtproteinkonformation. Die Werte wurden aus den bekannten Sekundärstrukturen von 15 Proteinen ermittelt.

$$P_{\alpha} = \frac{f_{\alpha}}{\bar{f}_{\alpha}} \qquad P_{\beta} = \frac{f_{\beta}}{\bar{f}_{\beta}}$$

Liegt das arithmetische Mittel $\bar{P}$ dieser Werte für ein Proteinsegment über 1 und ist gleichzeitig $\bar{P}_{\alpha} > \bar{P}_{\beta}$ oder umgekehrt, so wird das Vorliegen von α-Helix bzw. ß-Struktur angenommen. Eine geordnete Sekundärstruktur wird durch ein Tetrapeptid beendet, dessen mittlere $\bar{P}$-Werte unter 1 liegen.

IV. Experimentelle Ergebnisse zur Sekundärstruktur

Das Protein S8 und das daraus isolierte Bromcyanpeptid IV neigen zur spontanen Bildung von Fasern, deren hoher Orientierungsgrad eine röntgenographische Auswertung ermöglichte.
Die Interpretation der von Faseraufnahmen erhaltenen Röntgenreflexe (Dickerson, 1964; Vainshtein, 1966; Elliott, 1967) gestattet Aussagen über die Sekundärstruktur des Polypeptids.
Während die unbehandelte Faser relativ diffuse Reflexe ergab, führte das Aufziehen und Strecken der Fasern auf Mellanfiltern zu auswertbaren, wesentlich schärferen Reflexen (vgl. Abb.18) (Aufnahmetechnik s. Material und Methoden). Sämtliche im folgenden gezeigten Aufnahmen wurden nach dieser Methode angefertigt. Das Kalibrieren der Röntgenfilme erfolgte mit SiO_2, die Aufnahmen wurden mit einem Koinzidenzmaßstab ausgemessen.

1. Proteinfasern

Abb. 18: Faseraufnahme des Proteins S8

Die Auswertung der Aufnahme ergab eine hexagonale Zelle mit den Achsen

$$a = 18{,}9\ \text{Å}$$
$$c = 27{,}9\ \text{Å}$$

Raumgruppe $P\,6_5 22$

Die Dichte der S8-Faser wurde mit der Schwebemethode (Low und Richards, 1952) zu 1,21 $[g \cdot cm^{-3}]$ bestimmt.

Der Schichtlinienindex $l = 6$ für den Netzebenenabstand $d = 5{,}5$ Å entspricht einer "normalen", d.h. nicht gestauchten $3{,}6_{18}$ α-Helix. Der für $d = 1{,}5$ Å erhaltene Reflex, der auch eine α-Helix anzeigt, wurde durch Neigen der Faser um 35° gegen den Primärstrahl nach 40 h Belichtung erhalten. Der Helixgehalt der Faser wurde zu etwa 50 % bestimmt.

Der Orientierungsgrad der Faser konnte weder durch Tempern, d.h. mehrstündiges Aussetzen der Faser einer Temperatur von 110° C, noch durch Gegenwart typisch helikogener Reagenzien wie Trifluoräthanol, Hexafluorisopropanol oder Chloroform erhöht werden. Fasern, die mit 0.01 m $MgCl_2$ oder äquimolaren NaCl- oder KCl-Lösungen versetzt wurden, waren nur teilweise orientiert. Behandeln der Faser mit 0.02 m KH_2PO_4, pH 7.5, führte zur völligen Auflösung.

2. Fasern des Bromcyan-Peptids IV

Die insbesondere bei diesem Peptid ausgeprägte Neigung zur spontanen Faserbildung wird benutzt, um aus dem Vergleich der Faseraufnahmen von Protein und Peptid zu ersehen, ob Sekundärstrukturen in Bruchstücken von Proteinen erhalten bleiben können.

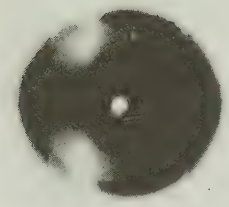

Abb. 19: Faseraufnahme des Bromcyan-Peptids IV

Die Auswertung der Aufnahme führte zu folgenden Ergebnissen:
hexagonales Kristallsystem mit den Achsen

$$a = 10{,}4\ \text{Å}$$
$$c = 27{,}0\ \text{Å}$$

Raumgruppe $P\,6_522$
Die Dichte wurde zu 1,2 $[g \cdot cm^{-3}]$ bestimmt.
Auch hier liegt eine "normale" $3{,}6_{18}\alpha$-Helix vor, der Helixgehalt beträgt etwa 45 %. Im Gegensatz zum S8-Faden ergab Tempern über 2 h bei 110° C eine etwas bessere Orientierung.

Die Abbildung 20 zeigt die Aufnahme eines Fadens, der beim Konzentrieren des in 6 m Harnstoff gelösten Bromcyan-Peptids entstand.
Das Auftreten von Reflexen, die ß-Strukturen zugeordnet werden müssen, zeigt an, daß die Faser eine Transkonformation von der helikalen zur ß-Struktur erlitten hat.

Die Auswertung ergab orthorhombisches Kristallsystem mit den

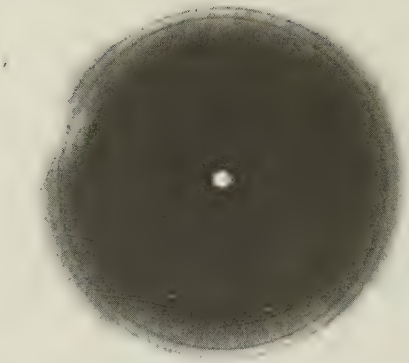

Abb. 20: Faseraufnahme des in ß-Struktur vorliegenden Bromcyan-Peptids

Achsen

a = 15,4 Å
b = 9,45 Å
c = 6,64 Å

Raumgruppe $P\ 2_1 2_1 2_1$

Um zu detaillierten Aussagen über die Struktur der Fasern zu gelangen, muß die Qualität der Aufnahmen weiter verbessert werden. Dies kann geschehen durch: Verwenden einer monochromatischen Strahlung (Germanium-Einkristall, Toroidspiegel), durch Eliminieren der Luftstreuung und Erhöhung der Röntgenintensitäten.

V. Assoziationsverhalten des Proteins S8

Ergebnisse der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese und der Polyacrylamidgelelektrophorese weisen darauf hin, daß das Protein S8 sogar in Gegenwart von Harnstoff zum großen Teil als Dimeres vorliegt.

Um diese Neigung zur Assoziation zu analysieren, wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitslauf durchgeführt und mit Hilfe bereits vorliegender hydrodynamischer Daten des Proteins (Paradies, 1973) das Molekulargewicht des sedimentierenden Teilchens bestimmt. Aus diesem Molekulargewicht ergibt sich durch Division mit dem aufgrund der Primärstruktur bekannten Molekulargewichts des Proteins S8, die unter Pufferbedingungen (pH 5.5, 0.25 mM $MgCl_2$; weitere Einzelheiten s. Material und Methoden) hydrodynamisch stabile Zahl, der das vermutete Aggregat bildenden S8-Monomeren.

Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt der mit Hilfe der Schlierenoptik alle 8 Minuten auf Photoplatte aufgenommenen Bilder.

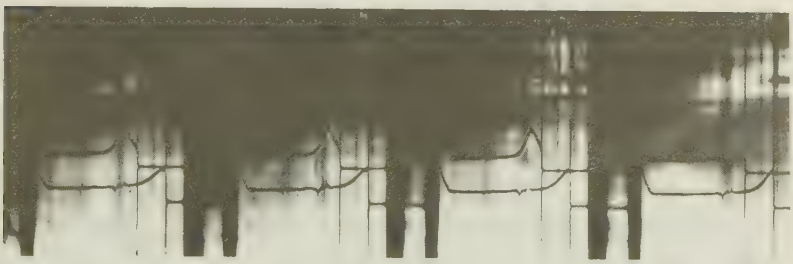

Abb. 21: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf des Proteins S8, Aufnahmen mittels Schlierenoptik

In Abbildung 22 sind die Logarithmen der Abstände (r) des Meniskus vom Rotationszentrum als Funktion der Zeit aufgetragen.

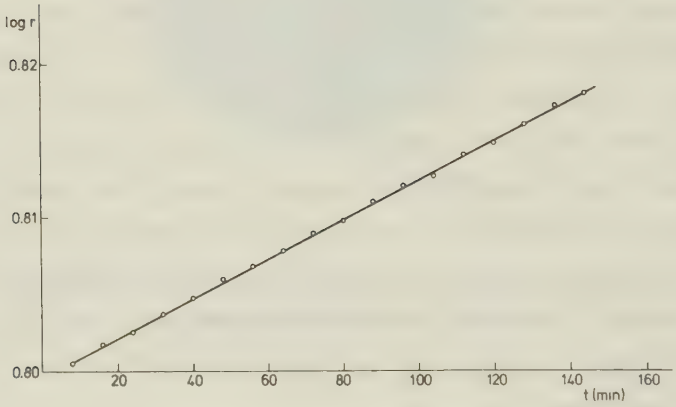

Abb. 22: Auswertung des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs, log r als f(t)

Aus der Steigung der Geraden $tg\alpha = 1{,}28 \cdot 10^{-4}$ ergibt sich nach

$$s_{app} = \frac{2{,}303 \cdot tg\alpha}{60\omega^2}$$

der scheinbare Sedimentationskoeffizient s_{app} bei 20° C zu $1{,}66 \cdot 10^{-13}$[sec]. Zur näherungsweisen Berechnung des Molekulargewichtes genügt es, s_{app} direkt, ohne Extrapolation auf C = 0, in die bekannte Svedberg-Formel (Svedberg, 1940) einzusetzen.

$$\bar{M} = \frac{R \cdot T \cdot s}{D(1 - \bar{V}\rho_1)}$$

D = Diffusionskoeffizient = $5{,}45 \cdot 10^{-7}$ [cm^2/sec]

$\bar{V}$ = partielles spezifisches Volumen des Proteins
= 0,73 [ml/g]

ρ_1 = Dichte des Lösungsmittels = 1,009 [g/ml]

Die bei 20° C ermittelten Meßwerte wurden von Paradies (unveröffentlichtes Manuskript) zur Verfügung gestellt.

Es ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 27000 Dalton, das bei Vergleich des Molekulargewichtes des Monomeren (etwa 12000, ohne Hydratation), einem Aggregat aus zwei S8-Molekülen entspricht.

VI. Versuche zur Protein-RNS Wechselwirkung

Das Protein S8 fungiert im 30S Partikel des Ribosoms als Ligand der 16S rRNS und nimmt dabei einen ganz bestimmten Bindungsort an der Nukleinsäure ein. Es vermag auch, neben einigen anderen Proteinen der 30S Untereinheit, einzeln an die isolierte 16S rRNS zu binden. Der entstehende Protein-16S rRNS-Komplex kann durch Gelelektrophorese und anhand des Elutionsprofils bei der Trennung des zur Komplexbildung führenden Rekonstitutionsansatzes an Agarosesäulen nachgewiesen werden (s. Material und Methoden).

Bei äquimolarem Ansatz von Protein, 16S rRNS und 23S rRNS der großen Ribosomenuntereinheit bindet S8 nur an die 16S rRNS, an die es auch im nativen Ribosom bindet. Auch bei Überschuß des Proteins enthält der entstehende Komplex nur Protein im molaren Verhältnis 1:1. Man bezeichnet dieses Verhalten als spezifische Bindung und nimmt an, daß die Konformation der bindenden Bereiche der Partner und die auftretende Protein-RNS Wechselwirkung dem intakten Ribosom entsprechend sind.

Ziel der folgenden Versuche war, bindende Bezirke des Proteins S8 einzugrenzen, um damit möglicherweise die Spezifität der Wechselwirkung aufzuhellen.

1. Experimente zur Komplexbildung mit der 16S rRNS

Bei der Elution der Rekonstitutionsansätze an Agarosesäulen ergeben sich für die S8 Proteine des Wildtyps und der Mutanten N4128 und N4003 Hinweise für eine an die 16S rRNS erfolgte Bindung. Aliquote der gleichen Ansätze wurden auf Polyacrylamidgelen analysiert; die Komplexbildung wurde bestätigt.

Das densitometrische Auswerten der Gelbanden ergab für die Mutante N4003 eine deutliche Schwächung der Bindung.
Abbildung 23 zeigt den typischen Verlauf einer Elutionskurve nach Komplexbildung zwischen Protein S8 des Wildtyps und der 16SrRNS. Bei den S8-Proteinen der Mutanten wurden ähnliche Kurven erhalten.

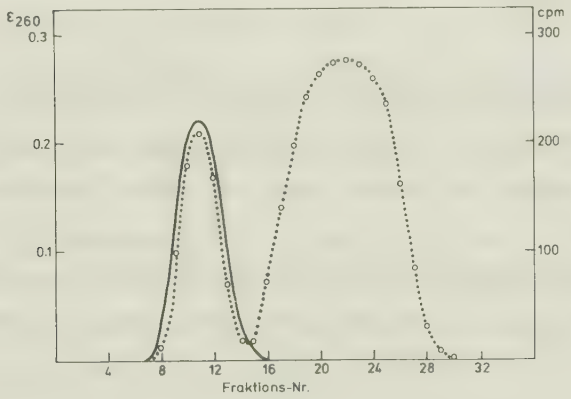

Abb. 23: Nachweis der Komplexbildung des Proteins S8 (gepunktete Linie) mit der 16S rRNS (durchgezogene Linie). Das Zusammenfallen der beiden Kurven in einem Gipfel zeigt Komplexbildung an.

260 = Extinktion der RNS bei 260 nm

cpm = Impulse/min der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler. Das Protein war radioaktiv (^{14}C) methyliert

Um zu überprüfen, ob auch Bruchstücke des S8-Proteins sich die Fähigkeit zur Bindung erhalten können, wurden die BrCN-Peptide IV des Wildtyps und der Mutanten mit der 16S rRNS rekonstituiert.

Das Auffinden ähnlicher Elutionsprofile, wie sie Abbildung 23 zeigt, läßt auch hier auf Bindung schließen. Der etwa 5-fach molare Überschuß der Peptide über die RNS und das errechnete Bindungsverhältnis im Komplex von ungefähr 1:1 (Fehler ± 20 %) machen unspezifische Bindung unwahrscheinlich, jedoch müssen die Ergebnisse durch Sättigungskurven (Schulte und Garrett, 1972) und Nachweis mit der Gelmethode in weiteren Experimenten abgesichert werden.

2. Tryptische Verdauung des 16S rRNS/S8 Komplexes

Dieser Versuch sollte zeigen, ob das Protein S8 nach erfolgter Bindung an die Nukleinsäure noch dem Angriff von Trypsin zugänglich ist.

Trotz hoher Enzymkonzentrationen war der Komplex zwischen 0° und 42° C völlig resistent gegen den Proteaseangriff. Der RNS-Faden scheint das Proteinmolekül völlig einzuhüllen.

D. DISKUSSION

I. Primärstruktur

Das Protein wurde fast ausschließlich mit der Technik des automatischen Edmanabbaues sequenziert. Die Sequenz des tryptischen C-terminalen Peptids T1 konnte trotz wiederholter Versuche am Festphasensequenator nicht im automatischen Verfahren ermittelt werden. Der Festphasensequenator lieferte für kleinere tryptische, lysinhaltige Peptide meist bereits beim ersten Versuch einwandfreie Resultate. Argininpeptide waren oft nur nach wiederholten Versuchen mit größeren Mengen sequenzierbar. Nebenreaktionen bei der Umwandlung des Arginins mit Hydrazin zum Ornithin unter relativ aggressiven Bedingungen dürften die Ursache sein. Das tryptische Peptid T16 mit C-terminalem Lysin konnte am Festphasensequenator überhaupt nicht sequenziert werden. Trotz guter Löslichkeit und nachgewiesener Bindung an die Trägermaterialien konnte kein Abbau erreicht werden. Das Peptid besitzt N-terminal zwei Glutaminsäuren; mögliche Wechselwirkung der negativ geladenen Seitenketten mit den polaren Oberflächen der Trägersubstanzen scheinen den Abbau zu verhindern. Dieses Peptid konnte jedoch mit sehr gutem Resultat bis zur C-terminalen Aminosäure im Proteinsequenator nach Modifikation der Lysinseitenketten mit hydrophilen Senfölen sequenziert werden.

Die Bindung der Carboxylgruppen von Peptiden an Harze nach der Carbodiimidmethode ist verhältnismäßig aufwendig und verläuft mit mäßigen Ausbeuten. Dadurch wird der prinzipielle Vorteil des Festphasensequenators, nämlich kleine Mengen (20-50 Nanomol) von kurzen Peptiden (2-15 Aminosäuren) ohne großen Arbeitsaufwand sequenzieren zu können, erheblich gemindert.

Die Sequenzierung kleinerer Peptide (bis etwa 10 Aminosäuren) mit geringem Materialeinsatz (50-100 Nanomol) wird jedoch bereits erfolgreich massenspektrometrisch durchgeführt (zahlr.Veröff.). Die rasche Verbreitung und Weiterentwicklung dieser eleganten Methode bietet eine gute Ergänzung zum Proteinsequenator, der kleine Peptide nur unter Einsatz großer Mengen (200-1000 Nanomol) wegen der entstehenden mechanischen Verluste zu sequenzieren vermag.

Das Zurückdrängen der Elutionsverluste durch Modifikation der ε-Aminogruppen lysinhaltiger Peptide nach Braunitzer ist ein befriedigender Ausweg. Die optimalen Reaktionsbedingungen im Proteinsequenator und die daraus resultierende große Zahl der auswertbaren Zyklen machen ihn bei größeren Peptiden dem Festphasensequenator prinzipiell überlegen.

Als zuverlässige Methode zur Auswertung der PTH-Aminosäuren erweist sich die Dünnschichtchromatographie. Diese vergleichsweise unkomplizierte Nachweismethode erlaubt die Unterscheidung aller PTH-Derivate und eine quantitative Beurteilung des fortschreitenden Abbaus. Im ersten Abbauschritt wird gleichzeitig die $R_e$inheit des Präparates ermittelt.

Bei der massenspektrometrischen Auswertung treten wegen der verschiedenen Verdampfungstemperaturen der PTH-Derivate charakteristische Molekül- und Fragmentionen bei verschiedenen Temperaturen in unterschiedlichen Intensitäten auf. Treten Nebensequenzen noch nicht merklich in Erscheinung, liefert diese sensitive Methode gute Resultate. Der Anschluß des verwendeten Massenspektrometers an einen Computer erlaubt das Subtrahieren

eines aufgenommenen Spektrums vom Spektrum des vorangehenden Abbauschrittes bei der jeweils gleichen Temperatur. Diese Differenzspektren eliminieren bei höheren Abbaustufen die PTH-Aminosäure des vorausgehenden Schrittes und führen oftmals noch zu klaren Resultaten, die mit anderen Methoden nicht mehr erhalten werden können. Die Gaschromatographie liefert gute Ergebnisse bei den leichter flüchtigen hydrophoben PTH-Aminosäuren, und diese Methode kann als ergänzende Methode zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren benutzt werden.
Die Erstellung der Sequenz wurde durch die relativ geringe Menge an verfügbarem Protein erheblich erschwert.

II. Mögliche Raumstruktur und Funktion des Proteins S8 im Ribosom

Die Primärstruktur des Proteins und die daraus resultierende Sekundär- und Tertiärstruktur lassen eine charakteristische drei-dimensionale Molekülоberfläche mit verschiedenen Bindungsorten entstehen, die eine stereospezifische Wechselwirkung mit Proteinen ebenso wie mit der ribosomalen RNS ermöglicht. Aus hydrodynamischen Messungen und Röntgenkleinwinkelstreuung (Paradies, 1974) wird auf ein langgestrecktes S8-Molekül mit einem Achsenverhältnis von 1:12 und einer Länge von etwa 80 Å geschlossen.

Bei der kontrollierten Verdauung des S8-16S rRNS Komplexes mit pankreatischer Ribonuklease kann man ein RNS-Fragment isolieren, das spezifisch an S8 bindet (Schaup et al., 1973) und deswegen resistent gegen die Nukleaseverdauung ist.

Die Basensequenz der 16S rRNS ist nahezu vollständig ermittelt, und daraus wurde eine Sekundärstruktur nach der Methode der maximalen Basenpaarung postuliert (Fellner et al., 1972). Das an S8 bindende RNS-Fragment wurde sequenziert (Ungewickell,1974) und konnte als Teil einer basengepaarten RNS-"Schleife" der 16S rRNS identifiziert werden. Das Fragment enthält etwa 40 Nukleotide, d.h. etwa 20 Nukleotide pro RNS-Strang, mit einer Länge, die ungefähr der des S8 Moleküls entspricht. Würde das Protein nur mit einem kleinen Teil des RNS-Stückes in Wechselwirkung stehen, so müßten andere Teile des RNS-Fragments für die Nukleasespaltung zugänglich sein. Man kann deshalb annehmen, daß das Protein sich in seiner ganzen Länge parallel zur Längsachse des RNS-Doppelfadens erstreckt.

Die längliche Struktur des Proteins dürfte von den starren Helixbereichen stabilisiert werden; insbesondere wäre von dem großen, sich von Position 30 bis 51 erstreckenden α-helikalen Bezirk eine ungefähre Ausrichtung seiner Helixachse in Richtung der Längsachse des Proteins zu fordern. Diese Helixachse würde damit auch etwa parallel zu dem RNS-Strang liegen.
Diese Annahme wird vor allen Dingen durch den erstaunlichen Befund unterstützt, daß bei dem BrCN-Peptid IV die Fähigkeit zur Bindung an die rRNS erhalten geblieben ist. Dieses Peptid entspricht dem Mittelstück des Proteins ohne 26 N-terminale und 14 C-terminale Aminosäuren und enthält damit, neben dem erwähnten Helixbereich von Position 30 bis 51, auch den Großteil aller postulierten Helixbereiche des ganzen Proteins. Es scheint seine intakte Raumstruktur, wie sie im Protein vorliegt, zu bewahren. Die fehlenden Endstücke dürften somit kaum Einfluß auf seine Sekundär- und Tertiärstruktur haben. Damit wird die Hypothese untermauert, daß für die Ausbildung von Sekundärstrukturen in Proteinen hauptsächlich Nahwechselwirkungskräfte verantwortlich sind (Chou und Fasman, 1974).
Der hohe α-Helixgehalt des Peptids ist röntgenographisch durch Faseraufnahmen bestätigt.
Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß geordnete helikale Bereiche als komplementäre Partner bei der Erkennung und Wechselwirkung der Bindungsorte des Proteins S8 mit der 16S rRNS eine wesentliche Rolle spielen. Aus den Helixzylindern ragen vor allem die langen Seitenketten der Arginine und Lysine heraus. Diese positiv geladenen Seitenketten scheinen prädestiniert zu sein, Salzbrücken mit den negativ geladenen, räumlich zu-

gänglichen Phosphatresten der Nukleinsäuren zu bilden.
Die Konzentration von sauren Aminosäuren im Sequenzbereich 41 bis 59, für den überwiegend Helixstruktur postuliert ist, könnte der Bindungsort für Nachbarproteine sein. Im Teilbereich 41 bis 51 liegen die sauren Seitenketten, bei Annahme einer α-Helix mit 3,6 Aminosäureresten pro Windung, deutlich auf einer Seite der Helix angeordnet. An S8 grenzende Proteine sind nachgewiesen (Lutter et al., 1972), desgleichen ein hydrodynamisch stabiler Komplex, der aus S8, S4 und S15 besteht (Paradies, 1974).
Die Möglichkeit, daß ungeordnete Proteinbereiche (random coil) mit ihrer größeren räumlichen Flexibilität, die oftmals an aktiven Zentren von Enzymen beteiligt sind, auch bei der Wechselwirkung des Proteins mit der RNS dominieren, ist unwahrscheinlich. Exakte"Paßformen", wie sie für die Erkennung einer RNS-Region zu fordern sind, werden nämlich durch rigide α-Helices oder ß-Strukturen besser repräsentiert; denn die Möglichkeit der Bindung an falschen Stellen wird durch sie eingeschränkt.
Die Ursache der Spezifität der Wechselwirkung des Proteins mit der RNS beginnt sich abzuzeichnen. Obwohl die Gesamtenergie der Wechselwirkung möglicherweise eine durch Wasser bedingte unpolare Assoziation ist, wird die Spezifität durch Kombination der gerichteten polaren Kräfte erreicht, die in durch Helices vorgegebenen genauen komplementären Abständen wirken.

Ob ähnliche Aussagen,wie die hier getroffenen, auch für andere ribosomale Bindungsproteine oder generell bei der kaum erforschten Protein-RNS Wechselwirkung zutreffen, bleibt abzuwarten.

Die Funktion des Proteins S8 im Ribosom dürfte in seiner Fähigkeit liegen, gleichzeitig Protein und RNS spezifisch zu binden. Es trägt so zum geordneten Aufbau und zur Stabilisierung der Struktur des 30S Partikels bei.

E. Zusammenfassung

Gegenstand der Untersuchung war das Protein S8 der Ribosomen von Escherichia coli. Dem Protein gilt besonderes Interesse, denn es ist a) Bestandteil der im Mittelpunkt der Proteinbiosynthese stehenden Ribosomen, deren Wirkungsweise erst verstanden werden kann, wenn seine Bauteile in Struktur und Funktion bekannt sind und bindet b) spezifisch an die ribosomale RNS, weshalb es als Modell zum Studium der weitgehend unerforschten Protein-RNS Wechselwirkung dienen kann, c) das Vorliegen zweier in den S8-Proteinen veränderten Mutanten eröffnet die Möglichkeit, Aussagen über die Funktion des Proteins im Ribosom zu treffen.

Die Primärstruktur des Wildtyps wurde ermittelt. Die Sequenzierung gelang unter Einsatz von 10 µMol Protein bei fast ausschließlicher Anwendung des automatischen Edmanabbaues im Protein- und Festphasensequenator. Aus zwei temperatursensitiven E. coli Mutanten wurden die veränderten S8-Proteine isoliert. Während bei der Mutante N4128 die Lokalisierung der Aminosäureaustausche gelang, konnte im S8-Protein der Mutante N4003 keine Veränderung der Primärstruktur festgestellt werden. Eine Methylierung einzelner Aminosäuren, die mit den geschilderten Methoden nicht erkannt werden konnte, wäre hier denkbar.

Es gelang Fasern des Proteins (Wildtyp) darzustellen und sie röntgenographisch zu charakterisieren. Daraus ergab sich ein α-Helixgehalt des Proteins von etwa 50%.

Nach Behandlung des Proteins mit Bromcyan konnte ein 69 Aminosäuren enthaltendes Peptid isoliert werden, dessen Helixgehalt durch Faseraufnahmen ebenso zu etwa 50% bestimmt wurde.

Wird bei einer Lösung des Peptids der pH von 7 überschritten, erfolgt eine Transkonformation in der ß-Strukturen überwiegen, wie Faseraufnahmen ergaben.

Aufgrund der Primärstruktur wurde eine Sekundärstruktur des Proteins postuliert. In Übereinstimmung mit den Röntgendaten ergab sich ein α-Helixgehalt von 50-55%.

Versuche zur Protein-RNS Wechselwirkung zeigten, daß dieses Peptid, dem intakten Protein entsprechend, die Fähigkeit zur Bindung an die ribosomale RNS behält. Während am S8-Protein der Mutante N4003 im Vergleich zum Wildtyp verminderte Bindung festgestellt wurde, wies S8 der Mutante N4128 keine gestörte Bindung auf.

Mit bereits vorliegenden Daten anderer Arbeitskreise über die Dimension des Proteinmoleküls und des mit dem Protein aggregierenden Teils der RNS, zeichnen sich mögliche Einzelheiten einer Protein-RNS Wechselwirkung ab: Helikale Proteinbereiche liegen mit ihren Achsen parallel zur Längsrichtung des basengepaarten RNS-Fadens; die in diesen starren Proteinstrukturen vorgegebenen Abstände ermöglichen gerichtete polare Kräfte mit dem sterisch komplementären Liganden, in denen die Spezifität der Protein-RNS Wechselwirkung liegen dürfte.

F. Literaturverzeichnis

Braunitzer,G., Schrank,B., Ruhfus,A., Petersen,S., Petersen, U.: Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse von Peptiden mit Quadrol. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732 (1971)

Chou,P.,J., Fasman,G.D.: Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, ß-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. Biochemistry 13, 211-222 (1974)

Chou,P.J., Fasman, G.D.: Prediction of Protein Conformation. Biochemistry 13, 222-245 (1974)

Cole,R.D.: S-Aminoethylation. In: Methods in Enzymology XI (C.H.W. Hirs ed.), 315-317. New York: Academic Press 1967

Crestfield,A.M., Moore,S., Stein,W.H.: The Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Reduced and S-Carboxymethylated Proteins. J. Biol. Chem. 238, 622-627 (1963)

Dickerson,R.E.: X-Ray Analysis and Protein Structure. In: The Proteins II (H. Neurath ed.), S.603. New York: Academic Press 1964

Diels,O., Alder,K.: Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. Chem. Ber. 62, 2081-2090 (1929)

Edman,P.: Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. Acta Chem. Scand. 4, 283-293 (1949)

Edman,P., Begg,G.: A Protein Sequenator. European J. Biochem. 1, 80-91 (1967)

Edman,P.: Sequence Determination. In: Protein Sequence Determination (S.B. Needleman ed.), 211-255. Berlin: Springer-Verlag 1970

Ehresmann,C., Stiegler,P., Fellner,P., Ebel,J.P.: The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli (2). Biochimie 54, 901-967 (1972)

Ehresmann,C., Stiegler,P., Zimmermann,R.A., Mackie,G., Ebel,J.P., Fellner,P.: The Determination of the Primary and Secondary Structure of the 16S Ribosomal RNA of Escherichia Coli. Nature, im Druck

Elias,H.G.: Ultrazentrifugen-Methoden. München: Beckman 1969

Elliott,A.: X-Ray Diffraction by Synthetic Polypeptides. In: Poly- -Amino Acids 1 (G. Fasman ed.), S. 1-64. New York: Marcel Dekker 1967

Fellner,P., Ehresmann,C., Ebel,J.P.: The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli (1). Biochimie 54, 853-900 (1972)

Garrett,R.A., Rak,K.H., Daya,L., Stöffler,G.: Specific Protein Binding Sites on 16S rRNA of E. coli. Molec. Gen. Genetics 114 (1971) 112-124

Garrett,R.A., Wittmann,H.G.: Structure of Bacterial Ribosomes. In: Advances in Protein Chemistry, S.248-347. New York: Academic Press (1973)

Hagenmaier,H., Ebbighausen,W., Nicholson,G., Vötsch,W.: Massenspektrometrische Identifizierung der Phenylthiohydantoin-Derivate von Aminosäuren. Z. Naturforsch. 25b, 681-689 (1970)

Hindennach,I., Stöffler,G., Wittmann,H.G.: Isolation of the Proteins from 30S Ribosomal Subunits of E. coli. Eur. J. Biochem. 23 (1971) 7-11

Hommard,J., Drapeau,G.R.: Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 3506-3509 (1972)

Kaltschmidt,E., Wittmann,H.G.:Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis as Applied to the Isolation of Ribosomal Proteins. Anal. Biochem. 30, 132-141 (1969)

Kaltschmidt,E., Dzionara,M., Wittmann,H.G.: Amino Acid Composition of Isolated Ribosomal Proteins from 30S and 50S Subunits of Escherichia Coli. Molec. Gen. Genet. 109, 292-297, (1970)

Kaltschmidt,E., Wittmann,H.G.: Two-Dimensional Polyacrylamide Gel-Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins. Anal. Biochem. 36, 401-412 (1970)

Kaltschmidt,E.: Isoelectric Points of Ribosomal Proteins of E. coli as Determined by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. 43, 25-31 (1971)

Laursen,R.A.: Solid-Phase Edman Degradation. Eur. J. Biochem. 20, (1971) 89-102

Laursen,R.A.: Manuskript in Vorberreitung (1974)

Liu,T.Y., Chang,Y.H.: Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid. J. Biol. Chem. 246, 2842-2848 (1971)

Low,B.W., Richards,M.F.: Determination of Protein Crystal Densities. Nature 170, 412-413(1952)

Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Lutter,L.C., Zeichhardt,H., Kurland,C.G.: Ribosomal Protein Neighborhoods. Molec. Gen. Genet. 119, 357-366 (1972)

Machleidt,W., Wachter,E., Scheulen,M., Otto,J.: Solid Phase Edman Degradation Of A Protein. FEBS Letters 37, 217-220 (1973)

Mazur,E.: A New Reagent for Detection of Peptides. J. Biol. Chem. 237, 1619-1621 (1962)

Merrifield,R.B.: Solid Phase Peptid Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963)

Mueller,M.J., Pierce,G.J., Davoll,H., Vigneaud,V.: The Oxydation of Oxytocin with Performic Acid. J. Biol. Chem. 191, 309-313 (1951)

Nomura, M.; Bacterial Ribosome. Bact. Rev. 34, 228-277 (1970)

Paradies,H.: Mündliche Mitteilungen,(1973,1974)

Paradies,H.: Manuskript in Vorbereitung (1974)

Phillips,S.L., Schlessinger,D., Apirion,D.: Mutants In Escherichia Coli Ribosomes: A New Selection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 772-777 (1969)

Pisano,J.J., Bronzert,T.J.: Analysis of Amino Acid Phenylthiohydantoins by Gas Chromatography. J. Biol. Chem. 244, 5597-5607 (1969)

Rice,R.H., Means,G.E.: Radioactive Labeling of Proteins in Vitro. J. Biol. Chem. 246, 831-832 (1971)

Riley,M., Perham,S.: The Reversibel Reaction of Protein Amino Groups with ETPA. Biochem. J. 118, 733-739 (1970)

Schaup,H.W., Sogin,M.L., Kurland,C.G., Woese,R.C.: Localisation of a Binding Site for Ribosomal Protein S8 within the 16S Ribosomal Ribonucleic Acid of Escherichia coli. J. Bacteriol. 115, 82-87 (1973)

Schulte,C., Garrett,R.A.: Optimal Conditions for the Interaction of Ribosomal Protein S8 and 16S RNA and Studies on the Reaction Mechanism. Molec. Gen. Genet. 119, 345-355 (1972)

Stadler,H.: The Primary Structure of the 16S RNA Binding Protein S8 from Escherichia Coli Ribosomes. FEBS Letters, im Druck

Svedberg,T.: Die Ultrazentrifuge. Leipzig, Theodor Steinkopff Verlag (1940)

Ungewickell,E., Garrett,R., Thresmann,C., Stiegler,P., Fellner, P.: An Investigation of the 16S RNA Binding Sites of Ribosomal Proteins S4, S8, S15, and S20 from Escherichia Coli. Europ.J. Biochem., im Druck

Vainshtein,B.K.: Diffraction of X-Rays by Chain Molecules. Amsterdam, Elsevier 1966

Wittmann-Liebold,B.: Amino Acid Sequence Studies on ten Ribosomal Proteins of Escherichia coli with an Improved Sequenator Equipped with an Automatic Conversion Device. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1415-1431 (1973)

Zubke,W., Stöffler,G., Wittmann,H.G., Apirion,D.: Manuskript in Vorbereitung (1974)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. H.G. Wittmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem, in Zusammenarbeit mit dem Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Frau Dr. B. Wittmann-Liebold und Herrn Prof. Dr. Dr. H. Paradies danke ich für Unterstützung.

Lebenslauf

Am 10. Juni 1944 wurde ich als Sohn des Mechanikers Martin Stadler und seiner Ehefrau Eva-Maria, geb. Albert, in Birkenstein (Oberbayern) geboren.

In München besuchte ich Volksschule und Gymnasium und legte dort am Rupprecht-Gymnasium im Sommer 1964 das Abitur ab.

Nach einem im Wintersemester 1964 begonnenem dreisemestrigen Studium der Betriebswirtschaftslehre an den Universitäten Würzburg und München, wechselte ich das Studienfach und nahm im Sommer 1966 das Studium der Chemie an der Universität Tübingen auf. Nach der Diplomvorprüfung im Frühjahr 1969, immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin und bestand im Frühjahr 1971 die Diplomhauptprüfung für Chemiker.

Diplom- und die vorliegende Doktorarbeit fertigte ich am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.H.G. Wittmann an.